

PCT/JP 2004/016912

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

08.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 3 年 1 1 月 1 1 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 3 - 3 8 1 6 0 6  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 3 - 3 8 1 6 0 6 ]

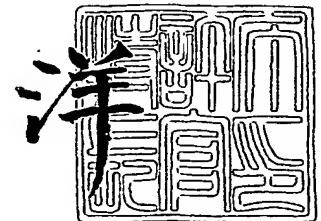
出      願      人                      ヒゲタ醤油株式会社  
Applicant(s):



2 0 0 5 年    1 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号    出証特 2 0 0 4 - 3 1 1 3 5 5 3

【書類名】 特許願  
【整理番号】 6734  
【提出日】 平成15年11月11日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 千葉県銚子市中央町 2-8  
                        ヒゲタ醤油株式会社 研究開発部内  
    【氏名】 花方 寛  
【発明者】  
    【住所又は居所】 千葉県銚子市中央町 2-8  
                        ヒゲタ醤油株式会社 研究開発部内  
    【氏名】 西条 孝幸  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000112060  
    【住所又は居所】 東京都中央区日本橋小網町 2 番 3 号  
    【氏名又は名称】 ヒゲタ醤油株式会社  
    【代表者】 濱口 敏行  
【代理人】  
    【識別番号】 100075775  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 戸田 親男  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 067287  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 9203880

## 【書類名】 特許請求の範囲

## 【請求項 1】

胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。

## 【請求項 2】

下記の菌学的性質を有し、胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。

## (a) 形態

細胞の大きさ

液体培地:  $0.4 \sim 0.6 \times 1.5 \sim 4 \mu\text{m}$

細胞の形

桿菌

胞子の有無

無

## (b) 生理学的性質

硝酸塩の還元

—

VP テスト

—

クエン酸の利用

+

ウレアーゼ

—

オキシダーゼ

+

カタラーゼ

+

## (c) 他の性質

温度抵抗性

60℃で死滅する。

## 【請求項 3】

胞子形成関連遺伝子 h o s が不活性化されたこと、を特徴とする胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。

## 【請求項 4】

胞子形成関連遺伝子 h o s の塩基配列が配列番号 1 に示す配列であること、を特徴とする請求項 3 に記載のブレビバチルス・チョウシネンシス。

## 【請求項 5】

胞子を形成せず、且つ、細胞外及び／又は細胞内のタンパク質分解酵素活性が低減ないし消失したブレビバチルス・チョウシネンシス。

## 【請求項 6】

下記の菌学的性質を有し、胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシス。

## (a) 形態

細胞の大きさ

液体培地:  $0.4 \sim 0.6 \times 1.5 \sim 4 \mu\text{m}$

細胞の形

桿菌

胞子の有無

無

## (b) 生理学的性質

硝酸塩の還元

—

VP テスト

—

クエン酸の利用

+

ウレアーゼ

—

オキシダーゼ

+

カタラーゼ

+

## (c) 他の性質

温度抵抗性

60℃で死滅する。

細胞外のタンパク質分解酵素活性

低いなし

細胞内のタンパク質分解酵素活性

低いなし

## 【請求項 7】

細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 e m p が不活性化されたこと、を特徴とするブレビバチルス・チョウシネンシス。

## 【請求項 8】

細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 *emp* の塩基配列が配列番号 3 に示す配列であること、を特徴とする請求項 7 に記載のプレバチルス・チョウシネンシス。

【請求項 9】

細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *imp* が不活性化されたこと、を特徴とするプレバチルス・チョウシネンシス。

【請求項 10】

細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *imp* の塩基配列が配列番号 5 に示す配列であること、を特徴とする請求項 9 に記載のプレバチルス・チョウシネンシス。

【請求項 11】

細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 *emp* 及び細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *imp* が不活性化されたこと、を特徴とするプレバチルス・チョウシネンシス。

【請求項 12】

胞子を形成しないこと、を特徴とする請求項 11 に記載のプレバチルス・チョウシネンシス。

【請求項 13】

プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 (FERM BP-08479)。

【請求項 14】

請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のプレバチルス・チョウシネンシスを、タンパク質をコードする遺伝子を組込んだ発現ベクターにより形質転換してなるプレバチルス・チョウシネンシス。

【請求項 15】

請求項 14 に記載のプレバチルス・チョウシネンシス形質転換体を培養する工程を含むこと、を特徴とするタンパク質の製造方法。

【請求項 16】

請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のプレバチルス・チョウシネンシスを組換えタンパク質生産の宿主として使用すること、を特徴とする組換えタンパク質を製造する方法。



【書類名】明細書

【発明の名称】新規ブレビバチルス・チョウシネンシス及び該微生物を宿主とするタンパク質の製造方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なブレビバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*) に関する。より具体的には、本発明は、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が格段に低減し、また、胞子を形成しないブレビバチルス・チョウシネンシスに関する。また該ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いた遺伝子組換えによるタンパク質製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

遺伝子組換え技術は、生体内に微量しか存在せず単離が難しいために従来は利用が著しく困難であったタンパク質、または、任意のアミノ酸配列を有するポリペプチドを、細菌または動物細胞などを宿主に用いて大量に生産することを可能にした。遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主には様々な細菌が用いられているが、最も広く用いられている細菌は大腸菌である。しかしながら、大腸菌を宿主とする組換えタンパク質生産系では、生産されたタンパク質が菌体内に蓄積されるため、細胞の容積が生産されたタンパク質の量の上限となってしまう、タンパク質の大量生産が難しい。また更に、細胞内に蓄積されたタンパク質を回収するために大腸菌菌体を破碎する必要があることや、大腸菌菌体の破碎物に含まれる菌体由来の成分である核酸、目的以外のタンパク質及び菌体の細胞壁に由来するエンドトキシン等から目的とするタンパク質を分離回収する操作が煩雑になるなどの問題がある。

【0003】

大腸菌の系が持つこれらの問題を回避するため、タンパク質を分泌生産する能力を有する代表的な細菌である枯草菌 (*Bacillus subtilis*) を宿主に用いた組換えタンパク質の生産系の開発が行われた。この枯草菌を宿主に用いた生産系では、生産された組換えタンパク質は培地中に分泌生産される。そのため、この枯草菌の系には、タンパク質を回収するための菌体破碎が不要であることやエンドトキシンがほとんど生じないことなどの大腸菌の系にはない優れた性質がある。

【0004】

ところが、一方で、枯草菌にはタンパク質分解酵素を大量に細胞外に分泌するという性質があるため、分泌生産された組換えタンパク質が、タンパク質分解酵素により分解されてしまい、組換えタンパク質の収量が極めて少なくなるという大きな問題があった。そのため、枯草菌のタンパク質分解酵素の産生を低減するための様々な努力が行われてきた。しかし、それにもかかわらず、枯草菌を宿主とする組換えタンパク質生産系が異種タンパク質の産業的な生産に用いられた例は、これまで知られていない。

【0005】

一方で、枯草菌の系が有するこの問題を回避するために、組換えタンパク質を細胞外に分泌生産するが、細胞外にタンパク質分解酵素を分泌しない細菌を宿主に用いた新たな組換えタンパク質生産系の開発が行われた。そして、その結果、枯草菌よりタンパク質分解酵素活性が弱く、なおかつ、枯草菌より優れたタンパク質の分泌生産性を示すバチルス・ブレビス 47 (*Bacillus brevis* 47) (特許文献1) を初めとするバチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) を宿主とする組換えタンパク質の生産系の開発に成功した。

【0006】

なお、現在、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) は、16S rRNA遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果、ブレビバチルス・チョウシネンシス (*Brevibacillus choshinensis*)、ブレビバチルス・ブレビス (*Brevibacillus brevis*) などからなるブレビバチルス (*Brevibacillus*) 属細菌に再分類されている (非特許文献1)。

【0007】

しかしながら、バチルス・ブレビス 47 にも細胞外に微弱なタンパク質分解活性が存在していることがわかった。バチルス・ブレビスを宿主とする組換えタンパク質生産においては比較的長時間（通常 3 日間程度）の培養が必要とされている。そのため、たとえばバチルス・ブレビス菌体の細胞外のタンパク質分解活性が微弱なものであっても、生産された組換えタンパク質が細胞外のタンパク質分解活性により分解されてしまい組換えタンパク質の収量が減少する場合があった。この問題の解決のために、これまでもバチルス・ブレビスの細胞外のタンパク質分解活性を更に低減させるための努力が行われてきた。

#### 【0008】

例えば、バチルス・ブレビス菌株のスクリーニングが広い範囲で行われ、細胞外のタンパク質分解活性が著しく低く、なおかつ、タンパク質の分泌生産性にも優れた菌株としてプレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31) (FERM BP-1087) (FERM BP-6863: バチルス・ブレビス H102 (*Bacillus brevis* H102) (特許文献 2) と同一株) や、その変異株であるプレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-S5 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-S5) (FERM BP-6623: 本菌株は、*Bacillus brevis* HPD31-S5 の表示で寄託された。) が分離された。そして、これらの菌株はヒト上皮細胞増殖因子 (hEGF) を初めとする様々な組換えタンパク質の生産において宿主として利用されている。例えば、プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 による hEGF の生産に関しては、非特許文献 2 (同文献においてプレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 は *Bacillus brevis* HPD31 と記載されている。) 他に示されている。

#### 【0009】

ところが、このプレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 及び HPD31-S5 においても、鋭敏なタンパク質分解活性の検出法を用いた場合には細胞外のタンパク質分解活性が検出されている。たとえば、プレビバチルス・チョウシネンシス HPD-31 の培養上清に対してゼラチン-PAGE (ザイモグラフ) 法によるタンパク質分解活性の検出を行った結果では、図 2 に示されているようにゼラチンの分解によるバンドが確認されている。

#### 【0010】

一方、タンパク質分解酵素活性 (タンパク質分解活性) を実質的に示さない変異バチルス・ブレビス菌株と称されるバチルス・ブレビス 31-OK 株も開示されている (特許文献 3)。しかしながら、このバチルス・ブレビス 31-OK においても、ゼラチン-PAGE 法によるタンパク質分解活性の評価試験の結果では、タンパク質分解活性が残存していることを示すバンドが確認でき、完全に細胞外のタンパク質分解活性が失われているわけではなかった。しかも、この細胞外のタンパク質分解活性についての遺伝子レベルでの解明は全くなされていなかった。すなわち、タンパク質分解酵素の単離は行われておらず、ましてや、その遺伝子の配列決定はおろか、クローニングさえ行われていなかった。

#### 【0011】

したがって、これらの細胞外のタンパク質分解活性が低減されたとされる菌株を用いた場合においても、菌株に残存する細胞外タンパク質分解活性により分泌生産されたタンパク質が分解され、その収量が減少する可能性があった。

#### 【0012】

また、これらのプレビバチルス・チョウシネンシス (もしくはバチルス・ブレビス) は、スクリーニングもしくは変異剤処理等による突然変異により得られたものであり、そのゲノム上のタンパク質分解酵素遺伝子を同定し、更に、該遺伝子の不活化を行うことにより得られたものではなかった。したがって、そのゲノム上のタンパク質分解酵素遺伝子を同定し、更に、該遺伝子の不活化を行うことによりタンパク質分解活性の低減を行ったプレビバチルス・チョウシネンシスはこれまで知られていなかった。

#### 【0013】

また、上記のプレビバチルス・チョウシネンシスのタンパク質分解活性の低減は、全て細胞外タンパク質分解活性の低減を目的としており、細胞内のタンパク質分解活性の低減

には注意が払われていなかった。ところが、ブレバチルス・チョウシネンシスを宿主とする組換えタンパク質生産において、目的とするタンパク質の種類によっては、分泌生産はできないが細胞内への蓄積生産であれば可能である場合がある。その場合、生産されたタンパク質によっては細胞内のタンパク質分解酵素の作用により分解されてしまい、組換えタンパク質がほとんど得られない場合があった。

#### 【0014】

また、ブレバチルス・チョウシネンシスは、培養中に一部の菌体の溶菌が起こり、その結果、培地中に細胞内タンパク質分解酵素を含むその細胞内のタンパク質が溶出することが知られている。そのため、細胞外に分泌生産された組換えタンパク質であっても、その溶出した細胞内タンパク質分解酵素により分解されてしまう可能性があった。

#### 【0015】

したがって、細胞内のタンパク質分解活性を低減することもまた、遺伝子組換え宿主としてのブレバチルス・チョウシネンシスの有用性をより高めるために解決すべき課題のひとつであった。

なお、これまで、ブレバチルス・チョウシネンシスの細胞内のタンパク質分解活性の低減化を行った例は、全く知られていない。

また、ブレバチルス・チョウシネンシスの細胞内のタンパク質分解活性に関する遺伝子レベルでの解明も、これまで全く行われていない。すなわち、これまでブレバチルス・チョウシネンシスの細胞内タンパク質分解酵素の単離を行った例は、全く知られていない。また、細胞内タンパク質分解酵素遺伝子のクローニング及び配列決定を行った例についても全く知られていない。

#### 【0016】

更に、ブレバチルス・チョウシネンシスを遺伝子組換え宿主として、より広範な産業上の用途に利用可能にするためには、上記のタンパク質分解活性の低減とは別の問題を解決する必要があった。

#### 【0017】

ブレバチルス・チョウシネンシスは、枯草菌などのバチルス属細菌と同様に孢子体を形成する場合がある。孢子体は生細胞（非孢子菌体）に比べて耐熱性が高く、かなり厳しい殺菌条件が要求される。そのため、特に、培養終了後に製造ライン内の孢子体を含めた菌体の完全な滅菌・除去の保証が求められる組換えタンパク質医薬品の製造において、ブレバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いて、その製造を行うためには、かなり難しい技術が要求された。

#### 【0018】

したがって、組換えタンパク質医薬品の製造を初めとする広範な産業上の用途においてブレバチルス・チョウシネンシスを組換え宿主として利用可能にするために、孢子体を形成せず、おだやかな殺菌条件（60℃から100℃）でも完全に死滅するブレバチルス・チョウシネンシス菌株が要望されていた。

#### 【0019】

なお、ブレバチルス・チョウシネンシスの孢子体の殺菌に必要とされる条件は、枯草菌の孢子体の殺菌に求められる条件よりはるかに弱い。たとえば、100℃での枯草菌の孢子体のD値（生細胞（非孢子菌体）及び孢子体を含むすべての菌数を1/10に減少させる、各温度域での時間）は菌株によって差があるものの11分程度とされている。一方、ブレバチルス・チョウシネンシスの孢子体では1分以下である。しかしながら、それでも、ブレバチルス・チョウシネンシスの孢子体の殺菌には、その生細胞（非孢子菌体）の殺菌に比べてかなり厳しい条件が必要になる。たとえば、後述の実施例に示すように、80℃でのブレバチルス・チョウシネンシスの生細胞（非孢子菌体）のD値は1分未満であるが、孢子体のD値は67分程度である。

#### 【0020】

枯草菌においては無孢子性菌株としてバシラス・サチリスSMS275（特許文献4：特開平4-287686）などが開示されている。しかしながらブレバチルス・チョウ

シネンシスにおいては、これまで孢子形成能を有しない菌株、すなわち、おだやかな殺菌条件でも完全に死滅する菌株は知られていなかった。

【特許文献1】特開昭60-58074号公報

【非特許文献1】Int. J. Syst. Bacteriol., 46, 939-946 (1996)

【特許文献2】特開昭63-56277号公報

【非特許文献2】Ann. NY Acad. Sci., 782, 115-122 (1996)

【特許文献3】特開平6-296485号公報

【特許文献4】特開平4-287686号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

前記のように、ブレビバチルス・チョウシネンシスは、遺伝子組換えの宿主として極めて優れた特性を有しているが、遺伝子組換えの宿主として、より一層、その産業上の有用性を高めるためには解決すべき課題がいくつかあった。

【0022】

それは、細胞外のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシスを得ること。また、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシスを得ること。また更には、孢子体を形成せず、したがって、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシスを得ることである。

【0023】

したがって、本発明は、細胞外のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の分泌生産効率が向上したブレビバチルス・チョウシネンシス。また、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産効率が向上したブレビバチルス・チョウシネンシス。孢子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシス。また更には、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の生産効率が向上し、なおかつ、孢子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するブレビバチルス・チョウシネンシスを提供することを目的とする。なお本発明において「細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減する」には該活性が完全に消失することも包含する。

【0024】

また更に、本発明は、該ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主として利用した遺伝子組換えによるタンパク質製造方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0025】

本発明者らは、まず孢子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスを得るために、組換えタンパク質生産の宿主として実績のあるブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 を親株に、変異剤処理による突然変異株の取得を試みた。

【0026】

まず、コロニーの形態の変化を指標にして変異が起きた株を選択することとし、通常のブレビバチルス・チョウシネンシスのコロニーの形態と異なりシワを有しないコロニーを形成した菌株を選択した。更に、これらの菌株の内から顕微鏡観察で孢子が確認できないものを、孢子形成能を有しない可能性がある菌株として選択した。更に、これらの孢子形成能を有しない可能性がある菌株に対して孢子形成能の評価試験を行い、孢子形成能を有しない菌株を選択した。そして、更に、この菌株を宿主に用いた組換えタンパク質の生産性の評価試験を行い、遺伝子組換えの宿主に利用されている公知の菌株であるブレバ

チルス・チョウシネンシスHPD31と同等の組換えタンパク質の生産性を有している変異株を選択した。以上により、本発明者らは、孢子形成能を有しないプレビバチルス・チョウシネンシスを得た。

#### 【0027】

本発明者らは、更に、細胞外及び細胞内のタンパク質分解酵素活性が、公知の菌株より格段に低減されたプレビバチルス・チョウシネンシス菌株を得るために、前記の孢子形成能を有しないプレビバチルス・チョウシネンシス菌株を親株に用いて、更に、細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活化を行った。本発明者らは、まず、不活化の対象となるタンパク質分解酵素遺伝子を同定するために、タンパク質分解酵素遺伝子のクローニングを試みた。その結果、本発明者らは2種類の新規のタンパク質分解酵素、すなわち、細胞内主要タンパク質分解酵素であるIMPと細胞外主要タンパク質分解酵素であるEMPの遺伝子のクローニングに成功し、更に、これらの遺伝子を不活化したプレビバチルス・チョウシネンシスを作製した。

#### 【0028】

なお、本発明者らは、プレビバチルス・チョウシネンシスのゲノム上の特定のタンパク質分解酵素遺伝子の不活化を、公知の相同組換えに準じた方法により行ったが、その際、後述のとおり、各遺伝子の不活化毎に薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子がゲノム上に残されることになる。そのため多重の遺伝子不活化を行うには、遺伝子不活化の都度、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子をゲノム上から削除する必要がある。本発明者らは、そのマーカー遺伝子の削除に、FRT配列と酵母由来のFlpリコンビナーゼ遺伝子からなる系を利用した。更に、その際、後述の実施例に示すように、Flpリコンビナーゼ遺伝子を有し、かつ、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合にはプレビバチルス・チョウシネンシスの菌体から容易に脱落するプラスミドDNAを新規に構築し、これを用いた。このプラスミドは、菌体内に導入しゲノム上に残されたマーカー遺伝子を削除した後、ネオマイシンを含まない培地で培養を行うことにより菌体から容易に脱落させることができる。このプラスミドを用いることにより多重遺伝子不活化が可能になった。

#### 【0029】

更に、本発明者らは、このようにして得た細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子を不活化したプレビバチルス・チョウシネンシス菌株について孢子形成能及びタンパク質分解活性の評価を行った。その結果、該菌株が孢子形成能を有していないこと、また、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株であるプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31より格段に低減したことを確認した。

#### 【0030】

また更に、このプレビバチルス・チョウシネンシス菌株を遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主に用いて、他の公知のプレビバチルス・チョウシネンシス菌株を宿主に用いた場合には分泌生産後に分解を受けることが確認されているタンパク質の生産を行った。その結果、タンパク質の蓄積量が、公知の菌株であるプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べて増加していることを確認し、本発明を完成させた。

#### 【0031】

以上により、本発明は、細胞外タンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の分泌生産効率が向上したプレビバチルス・チョウシネンシス、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したことにより、組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産効率が向上したプレビバチルス・チョウシネンシス、及び、孢子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。また更には、細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減されたことにより、組換えタンパク質の生産効率が向上し、なおかつ、孢子形成能を有しないことにより、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。

#### 【0032】

また更に、本発明は、該ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主として利用した遺伝子組換えによるタンパク質製造方法を提供する。

【0033】

以下、本発明を更に詳しく説明する。

【0034】

本発明の孢子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスは、親株であるブレビバチルス・チョウシネンシスに対して変異剤による薬剤処理を行い、薬剤処理の結果、得られた変異株の中から孢子形成能を有しない菌株を選択することにより取得した。実施例では、変異剤にニトロソグアニジンを使用した。変異剤として亜硝酸、メタンスルホン酸エチルなども利用可能である。或いは、紫外線、 $\gamma$ 線なども利用することができる。また、本発明の孢子形成能を有しない変異株を取得するための親株は、ブレビバチルス・チョウシネンシスに属する菌株であれば特に限定されないが、遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主として実績のあるブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 (FERM BP-1087)、または、その変異株のブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-S5 (FERM BP-6623) が特に好ましい。なお、得られた変異株の孢子形成能の有無は、耐熱性試験、或いは、D値の測定などにより行うことが可能である。また、D値 (D-value) は生細胞 (非孢子細胞) 及び孢子体を含むすべての菌数を  $1/10$  に減少させる各温度域での時間を意味し、菌体の死滅率の指標として用いられている。

【0035】

また、本発明が提供する孢子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシス菌株に対してゲノム・ライブラリーを用いた解析を行い、孢子形成に関連していると推定される遺伝子が不活化されている事を確認した。この不活化された遺伝子を h o s と命名した。孢子形成関連遺伝子 h o s の DNA 配列の例としてブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 の h o s の DNA 塩基配列を配列表の配列番号 1 (図 7、図 8 の上段) に示し、その DNA 塩基配列に対応するアミノ酸配列を配列番号 2 (図 7、図 8 の下段) に示した。

【0036】

また、本発明の細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が、格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシスは、ブレビバチルス・チョウシネンシスゲノム上の細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活化を行うことにより得ることができる。本発明のタンパク質分解活性が格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシスを得るために、不活化の対象とするブレビバチルス・チョウシネンシスのゲノム上のタンパク質分解酵素遺伝子は特に限定されないが、特に好ましいものとして細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 i m p 及び細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 e m p をあげることができる。

【0037】

細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子 e m p の DNA 配列の例として、ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 の e m p 遺伝子の DNA 塩基配列の配列番号 3 (図 9～11 の上段) に示し、その DNA 配列に対応するブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 の細胞外主要タンパク質分解酵素 EMP のアミノ酸配列を配列番号 4 (図 9～11 の下段) に示す。

【0038】

また、細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 i m p の DNA 配列の例として、ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 の i m p 遺伝子の DNA 塩基配列を配列番号 5 (図 12～13 の上段) に示し、その DNA 配列に対応するブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 の細胞内主要タンパク質分解酵素 IMP のアミノ酸配列を配列番号 6 (図 12～13 の下段) に示す。EMP 及び IMP は、いずれも、公知のタンパク質とアミノ酸配列に 40% 以上の相同性がない新規なタンパク質である。

【0039】

また、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは



付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもタンパク質分解活性を有する限り、全てタンパク質分解酵素EMPに包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」とは、アミノ酸残基の種類やタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置によっても異なるが、前記配列番号4のアミノ酸配列全体に対し、60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を意味する。

#### 【0040】

更に、配列番号6に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であってもタンパク質分解活性を有する限り、全てタンパク質分解酵素IMPに包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」とは、アミノ酸残基の種類やタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置によっても異なるが、前記配列番号6のアミノ酸配列全体に対し、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上の相同性を有するアミノ酸配列を意味する。

#### 【0041】

また、配列番号4に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であっても、そのコードしているタンパク質がタンパク質分解活性を有する限り、全てタンパク質分解酵素遺伝子emp（配列番号3）に包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」の意味は、上記したEMPについての場合と同様である。

#### 【0042】

また更に、配列番号6に記載のアミノ酸配列の一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする遺伝子であっても、そのコードしているタンパク質がタンパク質分解活性を有する限り、全てタンパク質分解酵素遺伝子imp（配列番号5）に包含される。ここで「一部のアミノ酸が置換、欠失、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」の意味は、上記したIMPについての場合と同様である。emp遺伝子及びimp遺伝子も、従来単離されたこともなければ、DNA配列の決定もされておらず、従来未知の新規遺伝子である。

#### 【0043】

このプレバチルス・チョウシネンシスのゲノム上の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子imp及び細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子empのクローニングは、Molecular Cloning 2nd ed., A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)等に記載の当業者に公知の標準的な遺伝子組換え技術を適宜、選択し、組み合わせて用いることにより行うことができる。たとえば、プレバチルス・チョウシネンシスのゲノムDNAライブラリーを作製し、このゲノムDNAライブラリーに対して、不活化対象となる遺伝子をコードするDNA配列の一部を有するDNA断片をプローブに用いたハイブリダイゼーション法により、もしくは、このDNA断片をプライマーとして用いるPCR法により行うことができる。

#### 【0044】

また、プレバチルス・チョウシネンシスのゲノム上のimp遺伝子またはemp遺伝子の不活化は、公知の相同組換えに準じた方法により行うことができる。例えば、imp遺伝子の不活化は、以下に示す手順により行うことができる。

#### 【0045】

まず、imp遺伝子を含むDNA断片をプレバチルス・チョウシネンシスで複製不可能なベクター、例えば大腸菌で複製可能なベクターにクローニングし、imp遺伝子内部の一部領域をFRT配列（Gene, 212, 77-86 (1998)）を両側に持つ薬剤耐性遺伝子（例えばネオマイシン耐性遺伝子）からなるDNA断片に置き換えimp遺伝子を分断する。その結果、その一部がネオマイシン耐性遺伝子に置きかわったことにより不活化されたimp遺伝子を含むベクターを得る。更に、このベクターに上記の不活

化された *imp* 遺伝子がゲノムDNAに組み込まれたブレバチルス・チョウシネンシス菌株を選択するための第二の薬剤耐性遺伝子（例えばエリスロマイシン耐性遺伝子）を挿入することにより、*imp* 遺伝子不活化用ベクターを構築する。

#### 【0046】

次いで、この *imp* 遺伝子不活化用ベクターをブレバチルス・チョウシネンシスに導入し、ネオマイシン耐性を示す菌株を選抜する。この *imp* 遺伝子不活化用ベクターの導入により、一部のブレバチルス・チョウシネンシス菌体において、ゲノム上の *imp* 遺伝子と、*imp* 遺伝子不活化用ベクター上の不活化された *imp* 遺伝子との間で相同組換え反応が誘発される。その結果、ネオマイシン耐性を示す菌株には、ネオマイシン耐性遺伝子-FRTカセットの上流側の *imp* 部のみで相同組換え反応が起こっている株、下流側の *imp* 部のみで相同組換え反応が起こっている株、上流側及び下流側の2箇所の *imp* 部で相同組換え反応が起こっている株（ダブルクロスオーバー株）が含まれることになる。

#### 【0047】

目的とするゲノム上の *imp* 遺伝子が不活化された菌株はダブルクロスオーバー株であり、また、ダブルクロスオーバー株はエリスロマイシンに対して感受性を示す。そのため、これらのネオマイシン耐性を示す菌株を、更に、エリスロマイシンを含むTM寒天培地で培養し、エリスロマイシンに対する感受性を示す菌株を選抜する。以上により、ゲノム上の *imp* 遺伝子が不活化されたブレバチルス・チョウシネンシス菌株を得ることができる。

#### 【0048】

上記で得たブレバチルス・チョウシネンシス菌株の *imp* 遺伝子の不活化の確認は、PCRとゲノミックサザン解析などにより行うことができる。

#### 【0049】

更に、上記で得た *imp* 遺伝子不活化株のゲノム上からネオマイシン耐性遺伝子の削除を行う。上記の *imp* 遺伝子不活化株に導入されたネオマイシン耐性遺伝子は、その上流域と下流域にFRT配列を有しているため、FRT配列を特異的に認識するF1pリコンビナーゼを用いたFRT配列間の組換え反応により上記で得た *imp* 遺伝子不活化株からネオマイシン耐性遺伝子を削除することが可能である。

#### 【0050】

具体的には、まず、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、ブレバチルス・チョウシネンシス菌体から容易に脱落するプラスミドベクターを調製する。更に、このプラスミドベクターに酵母由来のF1pリコンビナーゼ遺伝子（Nature, 286, 860-864 (1980)）とブレオマイシン耐性遺伝子を組み込んだネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターを作製する。

#### 【0051】

次いで、上記で得た *imp* 遺伝子不活化株に、このネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターを導入し、更に、ブレオマイシンを含むTM寒天培地上で培養することにより、このベクターにより形質転換された菌株を選別する。次いで、この形質転換された菌株を、ブレオマイシンを含まないTM液体培地で振とう培養後、更に、TM寒天培地で培養する。

#### 【0052】

目的とするネオマイシン耐性遺伝子が削除された *imp* 遺伝子不活化株は、ネオマイシン耐性遺伝子の両側のFRT配列間の組換え反応によりゲノム上のネオマイシン耐性遺伝子が削除され、なおかつ、ネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターが脱落している菌株である。この菌株は、ネオマイシンとブレオマイシンに対して感受性を示す。そこで、TM寒天培地上にコロニーが得られた菌株からネオマイシンとブレオマイシンに対して感受性を示す菌株を選抜することにより、目的とするネオマイシン耐性遺伝子が削除された *imp* 遺伝子不活化株を得た。

#### 【0053】

以上により、目的とする *imp* 遺伝子が不活化されたブレバチルス・チョウシネンシ



スの *imp* 遺伝子不活化株を得ることができる。以上の手順の概略を図 1 に示した。

#### 【0054】

また更に、タンパク質分解酵素遺伝子 *imp* 及び *emp* の双方とも不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシス菌株は、上記により構築した *imp* 遺伝子不活化株を親株に用いて、更に、そのゲノム上の *emp* 遺伝子を不活化することにより得ることができる。*emp* 遺伝子の不活化は、*imp* 遺伝子の不活化と同様の手順を繰り返すことにより可能である。

#### 【0055】

なお、上記の方法においてマーカー遺伝子として用いられるネオマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子等の薬剤耐性遺伝子は例示であって、上記の方法に用いられるマーカー遺伝子の種類は特に限定されない。任意の複数のマーカー遺伝子を用い、上記の手順に従うことにより相同組換えによる遺伝子の不活化を行うことができる。

#### 【0056】

以上に記したブレビバチルス・チョウシネンシスゲノム上の細胞外及び細胞内の主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活化により、本発明の細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が、公知の菌株より格段に低減したブレビバチルス・チョウシネンシス菌株を得ることができる。

#### 【0057】

ブレビバチルス・チョウシネンシス菌株のタンパク質分解活性は、ゼラチン-PAGE (ザイモグラム) 法またはアゾカゼインやアゾコール等のタンパク質をアゾ化した基質を用いた方法などにより測定することができる。

#### 【0058】

以上に記載の方法により得られた、本発明の孢子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスの例としては、実施例に示すブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP1 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP1) を挙げることができる。また、公知の菌株より格段に細胞内のタンパク質分解活性が低減し、なおかつ、孢子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスの例としては、実施例に示すブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP2 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP2) を挙げることができる。また更に、公知の菌株より格段に細胞外及び細胞内のタンパク質分解活性が低減し、なおかつ、孢子形成能を有しないブレビバチルス・チョウシネンシスの例としては、実施例に示すブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3) を挙げることができる。

#### 【0059】

ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 (*Brevibacillus choshinensis* HPD31-SP3) は、平成15年9月11日付で特許生物寄託センター (茨城県つくば市東一丁目1の1) にブダベスト条約下に国際寄託され、受託番号FERM BP-08479 が与えられた。

#### 【0060】

本発明に係るブレビバチルス・チョウシネンシスは、(イ) 孢子を形成しない、(ロ) 細胞外主要タンパク質分解酵素活性が低い、(ハ) 細胞内主要タンパク質分解酵素活性が低い、の3要件の内の少なくともひとつを有する点で特徴的であり、他の性質は、通常のブレビバチルス・チョウシネンシスと格段に相違するものではない。その菌学的性質は次のとおりである。

#### 【0061】

##### (a) 形態

細胞の大きさ

液体培地: 0.4 ~ 0.6 × 1.5 ~ 4 μm

孢子の形

桿菌

孢子の有無

無

細胞の多形性の有無 無  
運動性の有無 有(周毛)

## 【0062】

## (b) 生理学的性質

硝酸塩の還元	—
V P テスト (アセトインの生成)	—
インドールの生成	—
硫化水素の生成 (T S I 寒天培地)	+
クエン酸の利用	+
無機窒素源の利用	
硝酸塩	—
アンモニウム塩	+

## 【0063】

色素の生成 (キング培地)	—
ウレアーゼ	—
オキシダーゼ	+
カタラーゼ	+
O-F テスト	分解せず
ゼラチンの分解	—
グルコースから酸の生成	—
キシロースから酸の生成	—
ラクトースから酸の生成	—
マルトースから酸の生成	—
生育できる pH	6 ~ 8.5

## 【0064】

## (c) 他の性質

温度抵抗性	60℃で死滅する
細胞外のタンパク質分解酵素活性	低いなし (注1)
細胞内のタンパク質分解酵素活性	低いなし (注2)

## 【0065】

## (注1)

以下のいずれの方法においても培養上清中にタンパク質分解活性が検出されない。

(1) ゼラチン-PAGE によるゼラチンの分解活性測定法。

(2) 培養上清とアゾカゼインを反応させ、反応液の吸光度変化を計測するアゾカゼインの分解活性測定法。

(3) 培養上清とアゾコールを反応させ、反応液の吸光度変化を計測するアゾコールの分解活性測定法。

## 【0066】

## (注2)

ゼラチン-PAGE によるゼラチン分解活性の測定によっても、細胞内画分にゼラチン分解活性が検出されない。

## 【0067】

なお本発明において、「細胞外のタンパク質分解酵素活性が公知菌より格段に低減された」とは、アゾカゼイン法又はアゾコール法にて測定した場合の培養上清中の該酵素活性が、プレバチルス・チョウシネンシス公知菌株の該酵素活性の 1/10 以下、好ましくは 1/30 以下、更に好ましくは 1/100 以下にまで低下することをいい、後記する実施例では、1/120 以下、1/330 以下のデータも示されている。

## 【0068】

同じく「細胞内のタンパク質分解酵素活性が公知菌株より格段に低減された」とは、アゾカゼイン法により測定した場合の細胞内画分中の該酵素活性が、プレバチルス・チョ

ウシネンシス公知菌株の該酵素活性の  $1/2$  以下、好ましくは  $1/5$  以下、更に好ましくは  $1/8 \sim 1/10$  以下をいう。

**【0069】**

これらの低減値は、アゾカゼイン法やアゾコール法で測定した場合のものであるので、他の方法で測定した場合には、これらの低減値に基づいてそれぞれの低減値を規定すればよいことはいうまでもない。

**【0070】**

更に、本発明は、上記のブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主菌として用いる遺伝子組換えによるタンパク質生産方法を提供する。

**【0071】**

本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主菌として用いたタンパク質生産に用いられる発現ベクターは、ブレビバチルス・チョウシネンシス中で複製可能であるものならば特に限定されないが、好ましいものとしてバチルス・プレビス 47 の主要菌体外タンパク質遺伝子 (MWP 遺伝子) のプロモーター領域、ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 の主要菌体外タンパク質遺伝子 (HWP 遺伝子) のプロモーター領域を有する発現ベクターを挙げることができる。また、通常、ブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主とする組換えタンパク質生産系において生産されたタンパク質は、宿主細胞内に蓄積せずに、細胞外への分泌を行うため、プロモーター領域をコードする DNA 配列の 3' 末端側に分泌シグナルペプチドをコードする DNA 配列を含むものが望ましい。分泌シグナルペプチドをコードする DNA 配列として好ましいものとして、ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31 の主要菌体外タンパク質の分泌シグナルペプチドをコードする DNA 配列などを挙げることができる。

**【0072】**

具体的には、本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いた組換えタンパク質生産に用いられる発現ベクターとして好ましいものとして、pHT110 (特開平 6-133782)、pNY301 (特開平 10-295378) 等を挙げることができる。

**【0073】**

本発明において発現ベクターに組み込まれるタンパク質をコードする DNA は、本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスを宿主に用いた組換えタンパク質生産において、その発現が可能であるものであれば特に限定されない。例えば、サイトカイン、ケモカイン、酵素、ホルモンなどの遺伝子、もしくは、その他の任意のペプチドをコードする DNA 断片などのいずれであってもよい。また、遺伝子組換えにより生産されるタンパク質の用途も特に限定されない。その用途は医薬品、生化学試薬、産業用酵素などのいずれであってもよい。

**【0074】**

発現ベクターへのタンパク質をコードする DNA の挿入は、精製された当該タンパク質をコードする DNA を適当な制限酵素で処理することにより得た DNA 断片を発現用ベクターの適当な制限酵素切断部位またはマルチクローニングサイトに挿入し、連結するなどの当業者に公知の一般的な方法により行うことができる。

**【0075】**

更に上記のタンパク質をコードする DNA を組み込んだ発現ベクターを、本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスに導入することによりブレビバチルス・チョウシネンシスの形質転換を行うことができる。本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスへの発現ベクターの導入の方法も特に限定されず、当業者に公知の方法を適宜選択して行えばよいが、特に好ましい方法として、ブレビバチルス・チョウシネンシスへの発現ベクターの導入に通常用いられるエレクトロポレーション法を例示することができる。

**【0076】**

更に、この形質転換体を用いたタンパク質の生産は、この形質転換体を適切な培地に接種、培養し、培養終了後、タンパク質を回収・精製することにより行う。

## 【0077】

本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスの形質転換体の培養条件も、形質転換体の培養及び組換えタンパク質遺伝子の発現が可能なものであるならば、特に限定されないが、特に好ましい条件として、本明細書の実施例で用いたTM培地（ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.2%、グルコース 1%、pH 7.0）または2SL培地（ペプトン 4%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2%、pH 7.2）で30℃、2～4日間の培養条件を例示することができる。

また、必要に応じて、硫酸鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛などの無機塩類を適宜加えてもよい。

## 【0078】

更に、組換えタンパク質が分泌生産される場合には、培養終了後、遠心分離、ろ過などの一般的な方法でプレビバチルス・チョウシネンシスの培養細胞と分泌生産されたタンパク質を含む上清を分離することにより生産された組換えタンパク質を回収することができる。

## 【0079】

また、生産されたタンパク質が分泌生産されず、プレビバチルス・チョウシネンシスの細胞内に蓄積される場合にも、当業者に公知の方法を適宜用いることにより、細胞内に蓄積生産されたタンパク質を回収することができる。例えば、培養液から遠心分離、ろ過などの方法により菌体を採取し、次いで、この菌体を超音波破碎法、フレンチプレス法などにより破碎し、また必要に応じて界面活性剤等を添加して可溶化することにより、細胞内に蓄積生産されたタンパク質を回収することができる。

## 【0080】

更に、生産されたタンパク質の精製を行う場合には、当業者に公知の方法、たとえば溶媒抽出、限外濾過、硫酸アンモニウム沈殿、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、電気泳動、等電点沈殿などの方法を適宜、単独または組み合わせて用いることにより行うことができる。

## 【発明の効果】

## 【0081】

本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスは、遺伝子組換えによるタンパク質生産における宿主として利用することができる。

## 【0082】

本発明は、細胞外のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。該プレビバチルス・チョウシネンシスは、分泌生産される組換えタンパク質生産の宿主に用いられた場合、細胞外のタンパク質分解活性による組換えタンパク質の分解を顕著に抑制する。そして、このことにより、該プレビバチルス・チョウシネンシスは公知のプレビバチルス・チョウシネンシスより効率的な組換えタンパク質の分泌生産を可能にする。

## 【0083】

また、本発明は、細胞内のタンパク質分解活性が公知の菌株より格段に低減したプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。該プレビバチルス・チョウシネンシスは、細胞内に蓄積生産される組換えタンパク質生産の宿主に用いられた場合、細胞内のタンパク質分解活性による組換えタンパク質の分解を顕著に抑制する。そして、このことにより、該プレビバチルス・チョウシネンシスは公知のプレビバチルス・チョウシネンシスより効率的な組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産を可能にする。

## 【0084】

また更に、本発明は、胞子体を形成しないプレビバチルス・チョウシネンシスを提供する。該プレビバチルス・チョウシネンシスは、おだやかな殺菌条件で完全に死滅するため、組換えタンパク質医薬品の製造を初めとする産業上の広範な用途において組換えタンパク質生産の宿主として利用することが可能である。

したがって、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスは遺伝子組換えによるタンパク質生産の宿主として極めて有用である。本菌のひとつHPD31-SP3株を国際寄託したが(FERM BP-08479)、この菌株は上記3条件をいずれも満足する新規3重欠損株である。

#### 【0085】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明をこれらの実施例のいずれかに限定することを意図するものでない。

#### 【実施例1】

#### 【0086】

(孢子形成能を有しないプレビバチルス・チョウシネンシス変異株の取得)

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31(FERM BP-1087)(FERM BP-6863)に対してニトロソグアニジンによる変異剤処理を行い、孢子形成能を有しないプレビバチルス・チョウシネンシス変異株の取得を試みた。

#### 【0087】

まず、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31をTM液体培地(ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.2%、グルコース 1%、pH7.0)で一晩、30℃で培養した。培養終了後、遠心分離により菌体を回収し、更に、回収した菌体を滅菌水でODが0.1になるように洗浄希釈した。次いで、この菌体に100mg/LとなるようにNメチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを添加し、生存率が1~10%となるように振とうすることで、変異剤処理を行った。

#### 【0088】

次いで、変異剤処理を行った菌体を滅菌水で適宜希釈した後、TM平板培地に塗抹し、3日間30℃で培養を行い、TM平板培地上に菌株のコロニーを形成させた。通常のプレビバチルス・チョウシネンシスのコロニーと異なり、表面にシワがない平滑なコロニーを形成した菌株を選択し、更に、これらの選択した菌株の中から顕微鏡観察により孢子が確認できないものを孢子形成能を有しない可能性がある菌株として選択した。以上の変異処理及びコロニー形成を繰り返すことにより孢子形成能を有しない可能性がある変異株を5株得た。

#### 【実施例2】

#### 【0089】

(変異株の耐熱性試験による孢子形成能の評価)

実施例1で得た5株の変異株について耐熱性試験による孢子形成能の評価を行った。試験の対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

#### 【0090】

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及び変異株5株(No.1~No.5)をそれぞれTM寒天培地に塗布し、30℃で7日間静置培養した。なお、孢子体を形成させるために通常の培養期間より長い7日間の培養を行った。培養終了後、660nmにおける吸光度が1.0になるように菌体を0.8%NaClを含む滅菌蒸留水に懸濁し、菌体懸濁液100μlを80℃で10分間保温した後、TM寒天培地に塗布した。更に30℃の恒温で24時間培養し、生育したコロニー数から生菌数を計測した。

#### 【0091】

また、80℃加熱処理前の菌体懸濁液を段階的に滅菌蒸留水にて希釈後、TM寒天培地に塗布し、30℃の恒温で24時間培養した。培養終了後、生育したコロニー数から生菌数を計測した。以上の結果を表1に示す。

#### 【0092】

(表1)

菌株	生 菌 数	
	80℃加温前	80℃加温後
	出証特2004-3113553	

プレバチルス・チョウシネンシスHPD31	$3.3 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1	$4.3 \times 10^6$	0
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 2	$1.7 \times 10^7$	0
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 3	$2.6 \times 10^6$	0
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 4	$6.5 \times 10^6$	0
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 5	$8.1 \times 10^6$	0

## 【0093】

上記の表1が示すように、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31は、80℃、10分間の加温によって全菌数の約1/2程度しか死滅しないのに対し、プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5は同条件によって完全に死滅する。つまり耐熱性胞子を形成しないことが強く示唆された。

## 【実施例3】

## 【0094】

(変異株のD値の測定)

次いで、プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5について菌体のD値の測定試験を行った。試験の対照にはプレバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

## 【0095】

プレバチルス・チョウシネンシスHPD31及びプレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5のそれぞれをTM寒天培地に塗布し、30℃で7日間静置培養した。培養終了後、660nmにおける吸光度が1.0になるように菌体を0.8%滅菌食塩水に懸濁後、60℃、70℃及び80℃の各温度で保温し、保温開始から1分後、2分後、3分後、5分後、10分後、20分後、30分後、60分後の各々の時点で懸濁液を分取した。次いで分取した各々の懸濁液を冷却した後、TM寒天培地に塗布し30℃で24時間培養した。培養終了後、生育したコロニー数から菌数を計測した。更に、計測した菌数から胞子体の数を1/10に減少させる時間として菌体のD値を求めた。

## 【0096】

なお、通常、プレバチルス・チョウシネンシスの生細胞（非胞子菌体）は、60℃以上の温度域において直ちに死滅するため、試験開始後1分において残存している菌体は、すべて胞子体であると仮定して計算を行った。以上の結果を表2に示す。

## 【0097】

(表2)

菌 株	D 値 (分間)		
	60℃	70℃	80℃
プレバチルス・チョウシネンシスHPD31	330	94	67
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1	ND	ND	ND
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 2	ND	ND	ND
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 3	ND	ND	ND
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 4	ND	ND	ND
プレバチルス・チョウシネンシス変異株No. 5	ND	ND	ND

ND: 測定不能(1分未満)

## 【0098】

表2に示すとおり、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31については、各温度域での菌体のD値を求めることができた。しかしながら、プレバチルス・チョウシネン

シス変異株No. 1～No. 5については、各温度域での試験開始後、1分間以内に全ての菌体が死滅したため、いずれの温度域でも菌体のD値を求めることができなかった。この結果は、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5は、いずれも、孢子体を形成しなかったためであると考えられる。

#### 【0099】

以上に示した80℃、10分間の恒温試験及びD値の測定試験の結果により、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5は、孢子形成能を有さず、また、60℃に1分間置くことで完全に死滅することが確認された。

#### 【実施例4】

##### 【0100】

(変異株No. 1～No. 5を宿主に用いた組換えタンパク質(hEGF)の生産)

更に、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1～No. 5について組換えhEGFの生産を行うことにより組換えタンパク質の生産性の評価を行った。その手順と結果を以下に示す。対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

##### 【0101】

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及び変異株No. 1～No. 5のそれぞれを、ヒト上皮細胞成長因子(hEGF)を発現するプラスミドベクターpHT110-EGF(特開平6-133782)をエレクトロポレーション法により導入することで形質転換した。次いで、それぞれの菌株の形質転換体を2SL液体培地(ペプトン 4%、酵母エキス 0.5%、グルコース 2%、pH7.2)3mlを用いて30℃で60時間振とう培養した。変異株No. 4とNo. 5については形質転換体を得ることができなかった。

##### 【0102】

培養終了後、培養液を遠心分離し、上清画分を蒸留水によって10倍に希釈した後、HPLC分析に供した。得られたピーク面積から培養液中に分泌生産された組換えhEGFの量を算出した。その結果を表3に示す。なお、表3では、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31でのhEGFの生産量を100%として換算した値を示した。

##### 【0103】

(表3)

宿主菌株	hEGF相対生産量(%)
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	100
プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1	119
プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 2	40
プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 3	20

##### 【0104】

上記の表3が示すように、プレビバチルス・チョウシネンシス変異株No. 1を宿主に用いた場合のhEGFの生産量は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を多少上回っていた。また、その生育や形質転換効率もHPD31と同等であった。

上記変異株No. 1をプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1(Brevibacillus choshinensis HPD31-SP1)と命名した。

#### 【実施例5】

##### 【0105】

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1の変異遺伝子の同定)

また、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1のゲノム上で変異を受けた遺伝子の同定を行った。変異を受けた遺伝子の同定は、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムライブラリーを作製し、このライブラリーの各々をSP1に導入し孢子形成能が復活した菌株を選抜することにより行った。

## 【0106】

プレバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムライブラリーは以下の手順により作製した。まず、TM培地で15時間培養したプレバチルス・チョウシネンシスHPD31からゲノムDNAを調製し、次いで、制限酵素S<sub>au</sub>3A<sub>I</sub>によってゲノムDNAを部分的に処理し、ゲノムDNAの断片を得た。得られたゲノムDNAの断片と制限酵素B<sub>am</sub>H<sub>I</sub>で処理したプラスミドベクターpNY301とでライゲーション反応を行い、ゲノムライブラリープラスミドDNAを作製した。更に、これらのゲノムライブラリープラスミドDNAをエレクトロポレーション法によりプレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1に導入した。

## 【0107】

次いで、このゲノムライブラリープラスミドDNAを導入したプレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1の形質転換体を（抗生物質を含まない）TM液体培地で30℃で1時間培養し、更に、ネオマイシンを含むTM液体培地で30℃で3日間培養した。培養終了後、80℃で10分間加熱処理を行い、更に、TM寒天培地に塗抹し30℃で3日間培養した。この培養によりコロニーを形成した菌株を孢子形成能が復活した菌株として選択した。

## 【0108】

その結果、孢子形成能が復活した菌株が8株得られた。次いで、これらの8株から先に導入したプラスミドDNAを抽出し、そのDNA配列を決定した。その結果、8株の内、3株において新規な遺伝子がコードされた共通の翻訳枠が存在することが明らかになった。この結果から、変異株プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1は、変異剤処理によってこの遺伝子が不活化されて孢子形成能が失われたと推定した。この共通の翻訳枠にコードされた新規な遺伝子をh<sub>os</sub>と命名した。また、そのDNA配列を配列番号1（図7、図8の上段）に示した。

## 【0109】

更に、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を親株にh<sub>os</sub>遺伝子の不活化株を作製し、h<sub>os</sub>遺伝子の不活化によりプレバチルス・チョウシネンシスの孢子形成能が失われることを確認した。

## 【0110】

h<sub>os</sub>遺伝子不活化株の作製は、公知の相同組換えに準じた方法により行った。以下に、その具体的手順を示す。

## 【0111】

まずh<sub>os</sub>遺伝子不活化用ベクターの構築を行った。プライマーH<sub>os</sub> P1及びH<sub>os</sub> P2を用いたPCRによりh<sub>os</sub>遺伝子の上流部分のDNA断片（1.5kbp：上流側にK<sub>p</sub>n<sub>I</sub>，下流側にB<sub>am</sub>H<sub>I</sub>認識配列を導入）を増幅し、更に、このPCRで増幅した1.5kbpのDNA断片を制限酵素K<sub>p</sub>n<sub>I</sub>及びB<sub>am</sub>H<sub>I</sub>で処理しDNA断片を回収した。また、プライマーH<sub>os</sub> P3及びH<sub>os</sub> P4を用いたPCRによりh<sub>os</sub>遺伝子の下流部分の約1.5kbpのDNA断片（上流側にP<sub>s</sub>t<sub>I</sub>，下流側にX<sub>b</sub>a<sub>I</sub>認識配列を導入）を増幅した後、この約1.5kbpのDNA断片を制限酵素P<sub>s</sub>t<sub>I</sub>及びX<sub>b</sub>a<sub>I</sub>で処理しDNA断片を回収した。また更に、ネオマイシン耐性遺伝子を含みFRT配列（Gene, 212, 77-86（1998））を両側に持つDNA断片（1.4kbp）を制限酵素B<sub>am</sub>H<sub>I</sub>及びP<sub>s</sub>t<sub>I</sub>で処理しDNA断片を回収した。

## 【0112】

また、プレバチルス・チョウシネンシスで複製不可能なベクターであるpBlue<sub>script</sub><sup>R</sup> II SK+（東洋紡績株式会社）のS<sub>ac</sub>I認識配列に同制限酵素により切り出されたエリスロマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を挿入した。次いで、このプラスミドDNAのK<sub>p</sub>n<sub>I</sub>/X<sub>b</sub>a<sub>I</sub>制限酵素切断部位に、上述の3つのDNA断片を同時に導入することにより、h<sub>os</sub>遺伝子不活化用ベクターを構築した。以上により構築したh<sub>os</sub>遺伝子不活化用ベクターをpBlue-h<sub>os</sub>::Nm<sup>r</sup>とした。また、上記で使用したプライマーH<sub>os</sub> P1、H<sub>os</sub> P2、H<sub>os</sub> P3及びH<sub>os</sub> P4の塩基配列



を、それぞれ、配列番号 7、8、9、10 に示し、これらをまとめて図 14 に示した。

#### 【0113】

次いで、この h o s 遺伝子不活化用ベクター p B l u e - h o s : : N m<sup>r</sup> をエレクトロポレーション法によりプレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 に導入し、ネオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。更に、得られたネオマイシン耐性を示す株を、エリスロマイシンを含む T M 寒天培地に塗抹し、30℃で2日間培養し、エリスロマイシンに対する感受性を指標に菌株を選抜した。選抜した菌株の h o s 遺伝子不活化の確認は、P C R とゲノミックサザン解析より行った。更に、下記の実施例 7 に記載の手順に従って h o s 遺伝子不活化株からネオマイシン耐性遺伝子の削除を行い、プレバチルス・チョウシネンシスの h o s 遺伝子不活化株を得た。

#### 【0114】

次いで、この h o s 遺伝子不活化株について実施例 2、3 の手順に従って孢子形成能の評価試験を行い、孢子形成能を有していないことを確認した。

#### 【0115】

また更に、この h o s 遺伝子不活化株について実施例 4 の手順に従って組換えタンパク質の生産性評価試験を行い、h E G F の生産性がプレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 - S P 1 と同等であることを確認した。

#### 【0116】

以上の試験結果により、プレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 - S P 1 は、変異処理により h o s 遺伝子に変異が生じたため h o s 遺伝子が不活化しており、その結果、孢子形成能が失われたと結論した。

#### 【0117】

細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子が不活化されたプレバチルス・チョウシネンシスの作製

#### 【実施例 6】

#### 【0118】

(細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 i m p のクローニング)

(6-1) i m p のクローニング

不活化対象となるタンパク質分解酵素を特定するため、プレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 ( F E R M B P - 1 0 8 7 ) の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子のクローニングを行った。

#### 【0119】

実施例 5 に記載の手順に従って構築したプレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 のゲノムライブラリープラスミド DNA によって、プレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 を形質転換し、更に、これらの形質転換体を 1 % スキムミルクと終濃度 5 0 μ g / m l のネオマイシンを含む T M 寒天培地に塗抹し、30℃で4日間培養した。培養終了後、スキムミルクの分解を示すハローを形成した株を選抜した。

#### 【0120】

更に、上記で得た株からプラスミド DNA を抽出し、DNA 配列分析を行った。その結果、プレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 ゲノム由来の 3 . 6 k b p の DNA 断片中に約 1 . 4 k b p の翻訳枠 ( O R F ) 、また、その DNA 断片の相補配列に約 0 . 7 k b p の O R F が存在していた。この約 3 . 6 k b p の DNA 断片が含まれるプラスミドを p N Y - i m p と命名した。

#### 【0121】

上記の 3 . 6 k b p の DNA 断片に含まれるふたつの O R F の内、約 1 . 4 k b p の O R F のみを含むプラスミドと約 0 . 7 k b p の O R F のみを含むプラスミドを作製し、それぞれのプラスミドにより、プレバチルス・チョウシネンシス H P D 3 1 の形質転換を行った。

#### 【0122】

更に、それぞれの形質転換体を、1 % スキムミルクを含む T M 寒天培地で培養したとこ

ろ、約 1.4 kbp の ORF のみを有するプラスミドを含む形質転換体のみが TM 寒天培地上でハローを形成したため、この約 1.4 kbp の ORF にタンパク質分解酵素がコードされていることが明らかになった。この約 1.4 kbp の ORF にコードされたタンパク質分解酵素を細胞内主要タンパク質分解酵素 (intracellular major protease)、略して IMP と命名した。IMP と他の公知のタンパク質との間でアミノ酸配列の相同性検索を行ったが、有意な相同性を有するタンパク質は発見されなかった。

#### 【0123】

このプレバチルス・チョウシネンシス HPD31 株由来の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子 *imp* の DNA 塩基配列を配列番号 5 (図 12~13 の上段) に示し、その DNA 配列に対応する細胞内主要タンパク質分解酵素 IMP のアミノ酸配列を配列番号 6 (図 12~13 の下段) に示す。

#### 【0124】

(6-2) *imp* 遺伝子の発現及び IMP タンパク質の精製

次いで、IMP の性質の詳細を明らかにするために *imp* 遺伝子の発現及び IMP タンパク質の精製を行った。

#### 【0125】

まず、生産された IMP タンパク質の精製を容易にする目的で IMP の C 末端に 8 つのヒスチジンからなるペプチドタグ (ヒスチジントグ) を付加したポリペプチドを発現するプラスミドベクター pNY-*imp*-His を構築した。プラスミドベクター pNY-*imp*-His の構築は以下の手順により行った。

#### 【0126】

まず、センスプライマー *imp* P1 とアンチセンスプライマー *imp* P2 を用いて pNY-*imp* プラスミド DNA を鋳型とする PCR を行った。なお、センスプライマー *imp* P1 は、IMP の N 末端と推定されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列と相同なプライマーである。また、アンチセンスプライマー *imp* P2 は、ヒスチジントグをコードするため g t g を 8 回繰り返した DNA 配列を付加し、更に、ストップコドンと制限酵素 EcoRI 認識配列を導入したプライマーである。このセンスプライマー *imp* P1 の塩基配列を配列番号 11 に示し、アンチセンスプライマー *imp* P2 の塩基配列を配列番号 12 に示し、そして更に、これらをまとめて図 15 に示した。

#### 【0127】

この PCR により増幅されたヒスチジントグをコードする配列と *imp* 遺伝子を含む DNA 断片を精製後、制限酵素 XhoI と EcoRI で処理し約 500 bp の DNA 断片を得た。次いで、この DNA 断片をプラスミド pNY-*imp* の XhoI/EcoRI 制限酵素切断部位に挿入し、プラスミドベクター pNY-*imp*-His を得た。

#### 【0128】

次いで、上記で得たプラスミドベクター pNY-*imp*-His によりプレバチルス・チョウシネンシス HPD31 を形質転換し、得られた形質転換体を 600 ml の TM 液体培地で 30℃、48 時間振とう培養した。培養終了後、6000×g の遠心分離によって菌体を回収し、30 ml の洗浄緩衝液 (20 mM リン酸、pH 7.4、2 M KCl) に懸濁し、再度 6000×g の遠心分離によって菌体を回収した。この洗浄操作を 2 回繰り返した後、0.2 mg/ml のリゾチームと 10 単位の DNase を含む 30 mM の溶菌緩衝液 (20 mM リン酸、pH 7.4) に菌体を懸濁し、37℃ の恒温に 20 分間置いた。次いで、超音波処理によって菌体を破碎し、34000×g で 30 分間遠心し、上清を細胞内画分として回収した。細胞内画分 30 ml を 0.22 μm のフィルターによって濾過した後、終濃度 0.5 M の NaCl と 10 mM イミダゾールを添加し、1 ml のニッケルキレートカラム (アマシャムファルマシア社) に供した。10-500 mM イミダゾールの直線濃度勾配によってニッケルキレートカラムに吸着した IMP タンパク質を溶出し分取した。Quanticleave (登録商標) Protease Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc.) によって分画された溶出液のプロテアーゼ活性を測定し IMP 活性画分を同定した。更に、活性画分 5 μl を SD

S-PAGEに供しIMPタンパク質が電気泳動上で単一にまで精製されていることを確認した。

#### 【0129】

##### (6-3) IMPの性質

IMP 10  $\mu$ gを含むIMPの精製酵素標品をアクリルアミド10%濃度のSDS-PAGEによって分離した後、セミドライ式タンパク質転写装置によってタンパク質をPVDF膜に転写し、0.01% CBB (クマシーブリリアントブルー) と40%メタノールからなる染色液でIMPのタンパク質バンドを検出した。次いで、CBBを含まない40%メタノール液でPVDF膜を脱色した後、膜を乾燥させた。次いで、膜からIMPのタンパク質バンドを切り出し、そのN末端アミノ酸配列分析を行い、そのN末端配列がMetAsnHisProAspであることを確認した。以上により、IMPは453アミノ酸残基からなる推定分子量49,811Daの細胞内タンパク質分解酵素であることが判明した。

#### 【0130】

次いで、QuantiCleave (登録商標) Protease Assay Kit (Pierce Biotechnology, Inc.) を用いて、精製IMPの酵素化学的性質を詳細に検討した。基質であるスクシニル化カゼイン 2mgを100mM ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 65  $\mu$ lに溶解した酵素反応溶液に、IMPを1.5  $\mu$ g含む精製酵素標品10  $\mu$ lを加え37℃の恒温に20分間置いた。次いで、発色液25  $\mu$ lを添加し、20分間、室温で放置した。発色後、450nmの吸光度を測定することにより、IMPのタンパク質分解活性を定量した。このタンパク質分解活性の定量において30℃、60分間の反応により450nmの吸光度を0.1上昇させる酵素量を1単位とし、反応に用いた酵素タンパク質量はBSAを標準としてBradford法により定量した。

#### 【0131】

以上の結果により、IMPの至適温度は30℃、至適pHは8.0、比活性は44.7 units/mg proteinであり、またIMPは1mM以上のEDTAにより活性が阻害されることが明らかになった。

#### 【実施例7】

#### 【0132】

(細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子impが不活化されたプレバチルス・チョウシネンシスの作製)

#### 【0133】

次いで、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP1を親株にimp遺伝子が不活化されたプレバチルス・チョウシネンシスの作製を行った。imp遺伝子が不活化されたプレバチルス・チョウシネンシスの作製は相同組み換えによる遺伝子の不活化法に準じた方法を用いた。具体的には、以下の手順により行った。

#### 【0134】

まず、imp遺伝子不活化用ベクターの構築を行った。制限酵素EcoRVによってimp遺伝子の内部領域である1kbpのDNA断片を切り出し、プラスミドベクターpBlue-script<sup>®</sup> II SK+ (東洋紡績株式会社) のSmaI/EcoRV制限酵素切断部位に挿入した。次いで、制限酵素PstIで処理することによってimp遺伝子内部の120bpの領域を除去し、ネオマイシン耐性遺伝子を含みFRT配列を両端に持つDNA断片をPstI制限酵素切断部位に挿入することにより、imp遺伝子を分断した。更に、このプラスミドのBamHI制限酵素切断部位に同制限酵素によって切り出されたエリスロマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を挿入することにより、imp遺伝子不活化用ベクターを構築した。以上により構築したimp遺伝子不活化用ベクターをpBlue-imp::Nm<sup>r</sup>とした。

#### 【0135】

次いで、このimp遺伝子不活化用ベクターpBlue-imp::Nm<sup>r</sup> 1  $\mu$ gをエ

レクトロポレーション法によりブレビバチルス・チョウシネンシス HPD 31-SP1 に導入し、ネオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。得られたネオマイシン耐性を示す菌株を終濃度  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  のエリスロマイシンを含む TM 寒天培地 (ペプトン 1%、肉エキス 0.5%、酵母エキス 0.2%、グルコース 1%、寒天 1.5%、pH 7.0) に塗抹し、 $30^\circ\text{C}$ 、2 日間培養し、imp 遺伝子の上流域と下流域の 2 箇所の遺伝子座で相同組み換え反応を起こした株 (ダブルクロスオーバー株) をエリスロマイシンに対する感受性を指標に選抜した。更に、選抜した菌株に対して PCR とゲノミックサザン解析を行い imp 遺伝子が不活化されている事を確認した。

#### 【0136】

次いで、上記で構築した imp 遺伝子不活化株のゲノムからネオマイシン耐性遺伝子の削除を行った。imp 遺伝子不活化株からネオマイシン耐性遺伝子を削除するために、まず、酵母由来の F1p リコンビナーゼ遺伝子とブレオマイシン耐性遺伝子を有するネオマイシン耐性遺伝子削除用プラスミドベクターを以下の方法により構築した。

#### 【0137】

まず、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、ブレビバチルス・チョウシネンシスの菌体から容易に脱落するプラスミドベクターを得るために、pNY301 プラスミドベクター (特開平 10-295378) に対してヒドロキシルアミンによる薬剤処理を行い、その変異体を得ることにした。具体的には、以下のようにして行った。

#### 【0138】

pNY301 プラスミドベクター DNA  $1.5 \mu\text{g}$  を、ヒドロキシルアミン  $350 \text{mg}$  と NaOH  $90 \text{mg}$  を氷冷した滅菌蒸留水  $5 \text{ml}$  に溶解した溶液 ( $100 \mu\text{l}$ ) に溶解し、 $70^\circ\text{C}$  の恒温に 120 分間おいた後、プラスミド DNA をエタノール沈澱により濃縮、乾燥させた。更に、このプラスミド DNA を滅菌蒸留水に溶解し、 $100 \text{ng}$  相当の該プラスミド DNA により、ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD 31 を形質転換し、ネオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。生育速度が遅くコロニーサイズが小さい形質転換体から得られたプラスミド DNA は、元の pNY301 プラスミドベクター DNA に比べ 1 細胞あたりのコピー数が数十分の 1 に低下しており、かつ、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、菌体から容易に脱落した。

#### 【0139】

このプラスミド DNA を鋳型に EcoRI と PstI 認識配列を付加したセンスプライマー f1p P1 (配列番号 13: 図 16) と BamHI 認識配列を付加したアンチセンスプライマー f1p P2 (配列番号 14: 図 17) を用いて PCR を行い、rep 遺伝子を含む約  $1.6 \text{kb}$  の DNA 断片を増幅した。更に、約  $1.6 \text{kb}$  の DNA 断片を制限酵素 EcoRI と BamHI で処理した。

#### 【0140】

また、ブレオマイシン耐性遺伝子を有する pNH300 プラスミド (Yasuhiro, Shiga et al, Applied and Environmental Microbiology, 58, 525-531 (1992)) を鋳型に BglII 認識配列を付加したセンスプライマー f1p P3 (配列番号 15、図 18) と EcoRI と XbaI 認識配列を付加したアンチセンスプライマー f1p P4 (配列番号 16、図 19) によって PCR を行いブレオマイシン耐性遺伝子とプラスミド Ori を含む約  $1.1 \text{kb}$  の DNA 断片を増幅した。更に、 $1.1 \text{kb}$  の DNA 断片を制限酵素 EcoRI と BglII で処理し、上記で得た約  $1.6 \text{kb}$  と約  $1.1 \text{kb}$  の両 DNA 断片を結合させることにより新たなプラスミドを作製した。このプラスミドを pNY-Mut-B1e とした。

#### 【0141】

また、酵母由来の  $2-\mu\text{m}$  プラスミドを鋳型に、NcoI 認識配列を付加したセンスプライマー f1p P5 (配列番号 17: 図 20) と XhoI 認識配列を付加したアンチセンスプライマー f1p P6 (配列番号 18: 図 21) を用いて PCR を行い、F1p リコンビナーゼ遺伝子を含む領域を増幅した。次いで、この PCR により得た F1p リコ

ビナーゼ遺伝子を含むDNA断片をNcoIとXhoIで処理した後、pNY301ベクターのNcoI/XhoI制限酵素切断部位に挿入することによりF1pリコンビナーゼ遺伝子を含むベクターを得た。このベクターをpNY301-F1pとした。

#### 【0142】

次いで、このpNY301-F1pを鋳型にXbaI認識配列を付加したセンスプライマーf1p P7（配列番号19：図22）とPstI認識配列を付加したアンチセンスプライマーf1p P8（配列番号20：図23）を用いてPCRを行い、F1pリコンビナーゼ遺伝子及びpNY301由来のプロモーター領域を含む約1.6kbpのDNA断片を増幅した。更に、この約1.6kbpのDNA断片を制限酵素XbaIとPstIで処理した後、上記で得たpNY-Mut-BleのXbaI/PstI制限酵素切断部位に挿入することによりネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターを構築した。このネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターをpNY-Mut-Ble-F1pとした。このpNY-Mut-Ble-F1pは、F1pリコンビナーゼ遺伝子を発現し、かつ、ネオマイシンを含まない培地を用いて培養を行った場合には、ブレビバチルス・チョウシネンシスの菌体から容易に脱落するプラスミドベクターである。

#### 【0143】

次いで、このネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターpNY-Mut-Ble-F1pをエレクトロポレーション法によりimp遺伝子不活化株に導入し、ブレオマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜した。次いで、この形質転換体を、ブレオマイシンを含まないTM液体培地で振とう培養し、更に、TM寒天培地で培養した。TM寒天培地上にコロニーが得られた菌株からネオマイシンとブレオマイシンに対して感受性を示す菌株を選抜した。

#### 【0144】

以上により、ネオマイシン耐性遺伝子が削除され、かつ、ネオマイシン耐性遺伝子削除用ベクターpNY-Mut-Ble-F1pが脱落した、目的とするブレビバチルス・チョウシネンシスのimp遺伝子不活化株を得た。このゲノム上の細胞内主要タンパク質分解酵素遺伝子impが不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスをブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2 (Brevibacillus choshinensis HPD31-SP2) と命名した。

#### 【0145】

（細胞内と細胞外の主要タンパク質分解酵素遺伝子が不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスの作製）

次いで、上記で得たimp遺伝子が不活化されたブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2に対して細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子の不活化を行った。そのために、まず、細胞外主要タンパク質分解酵素の単離、及び、同遺伝子のクローニングを行った。

#### 【実施例8】

#### 【0146】

（細胞外主要タンパク質分解酵素（Extracellular Major Protease, EMPと略記）遺伝子のクローニング）

#### （8-1）細胞外主要タンパク質分解酵素（EMP）の精製

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087) を5LのTM液体培地で24時間培養し、培養終了後、培養上清液を遠心分離により分画し、終濃度50mMのトリス塩酸 (pH 7.5) を添加した後、DEAE陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、0-0.6M NaClの直線濃度勾配によりEMPを溶出した。

#### 【0147】

EMP含有画分を50mMトリス塩酸 (pH 7.5) の緩衝液に対して透析した後、ヘパリンカラムに供し、0-0.5MのNaClの直線濃度勾配により溶出し、EMP精製酵素標品とした。また、各溶出画分の酵素活性測定は、Analytical Bioc

hemistry, 102, 196-202 (1980)の方法に準じたゼラチン-PAGEにより行った。

#### 【0148】

##### (8-2) EMPのアミノ酸配列分析

###### 8-2-1 N末端アミノ酸配列分析

EMP精製酵素標品10 $\mu$ gをアクリルアミド10%濃度のSDS-PAGEによって分離した後、セミドライ式タンパク質転写装置によってタンパク質をPVDF膜に転写し、0.01% CBBと40%メタノールからなる染色液でEMPのタンパク質バンドを検出した。CBBを含まない40%メタノール液で脱色した後、膜を乾燥させ、タンパク質バンドを含む膜を切り出し、ABIプロテインシーケンサーmodel 492によりN末端アミノ酸配列分析を行った。このアミノ酸配列分析により、AlaSerLysArgValHisThrAspAsnLeuValIleAlaLeuValGluPheAsnAspLeuGluGlyAsnGlnの24アミノ酸残基からなるN末端のアミノ酸配列を決定した。

#### 【0149】

###### 8-2-2 内部部分アミノ酸配列分析

EMP精製酵素標品50 $\mu$ gをアクリルアミド10%濃度のSDS-PAGEによって分離した後、EMPのタンパク質バンドを含むゲル片を切り出し、更に、current protocols in protein science, 11.3 digestion of proteins in gel for sequence analysis, John Wiley & Sons, 1995の方法に従い、EMPをトリプシン1 $\mu$ gによりゲル内酵素処理を行いゲル内で限定分解した。次いで、トリプシン処理をしたEMPのペプチド断片をアセトニトリル溶液で回収した後、マイティシルアクAPR18逆相カラムクロマトグラフィー（関東化学株式会社）に供し、0.05%TFAを含むアセトニトリル0-60%の直線濃度勾配によってEMPのペプチド断片を溶出した。更に、溶出分離したEMPのペプチド断片のひとつを乾固した後、ABIプロテインシーケンサーmodel 492により一つのペプチドについてアミノ酸配列分析を行った。このアミノ酸配列分析により、IlePheGlnThrGlnProThrGlyPheAspの10アミノ酸残基からなる内部部分アミノ酸配列を決定した。

#### 【0150】

##### (8-3) emp遺伝子のクローニング及び同定

次いで、上記で得たEMPの内部部分アミノ酸配列データを基に、下記に示す2種のオリゴヌクレオチドプライマーemp P1及びemp P2を設計、合成した。emp P1及びemp P2の塩基配列を、それぞれ、配列番号21及び配列番号22に示し、それらをまとめて且つそれらに対応するアミノ酸配列を図24に示す。但し、配列番号21左から6番目のn及び配列番号22の左から6番目のnは、それぞれ、イノシンを表わす。

#### 【0151】

これらのプライマーemp P1及びemp P2を用いて、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムDNAを鋳型とするPCRを行い、約700bpのDNA断片を増幅した。更に、この約700bpのDNA断片をpUC118ベクター（東洋紡績株式会社）のHincII認識配列にサブクローニングしDNA配列分析を行い、この約700bpのDNA断片がemp遺伝子の一部を含んでいることを確認した。

#### 【0152】

更に、この約700bpのDNA断片の上流域及び下流域のDNA断片をクローニングするために、上記で得た約700bpのDNA断片のDNA配列データを基に下に示す2種類の特異的プライマー、上流域の増幅用にアンチセンスプライマーemp P3、下流域の増幅用にセンスプライマーemp P4を設計、合成した。

#### 【0153】

また、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31のゲノムDNAをEcoRV等の制限酵素によって断片化し、更に、これらのDNA断片の末端にアダプターDNAを付加

することによりプレバチルス・チョウシネンシスHPD31のアダプターゲノムDNAライブラリーを作製した。

#### 【0154】

アンチセンスプライマーemp P3、センスプライマーemp P4、アダプターDNAの塩基配列を、それぞれ、配列番号23、24、25に示し、これらをまとめて図25に示す。

#### 【0155】

次いで、このプレバチルス・チョウシネンシスHPD31ゲノムのアダプターDNAライブラリーを鋳型に用いてPCRを行い、emp遺伝子全長を含むDNA断片を増幅した。更に、得られたPCR増幅産物のダイレクトシーケンスによりemp遺伝子のDNA配列を決定した。

#### 【0156】

このプレバチルス・チョウシネンシスHPD31株由来の細胞外主要タンパク質分解酵素遺伝子empのDNA配列を配列番号3（図9～11の上段）に示し、そして、そのDNA配列に対応する細胞外主要タンパク質分解酵素EMPのアミノ酸配列を配列番号4（図9～11の下段）に示す。

#### 【0157】

##### (8-4) EMPの性状

細胞外主要タンパク質分解酵素EMPは、プレプロ構造として754アミノ酸残基からなる分子量約84kDaの酸性タンパク質であり、細胞外に分泌される際にN末端124アミノ酸残基が切断され、630アミノ酸残基からなる分子量約71kDaの構造体へと成熟すると推定した。成熟体のN末端から207番目にはZincメタロタンパク質分解酵素の亜鉛イオンの配位に関与するとされるHEXXH配列が存在することから、EMPはZincメタロタンパク質分解酵素であると推定した。

EMPは*Clostridium acetobutylicum*のメタロタンパク質分解酵素とアミノ酸レベルで37%の相同性を有していた。

#### 【実施例9】

#### 【0158】

(imp遺伝子とemp遺伝子が不活化されたプレバチルス・チョウシネンシス菌株の作製)

次いで、実施例7で得たプレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2を親株にemp遺伝子の不活化を行い、2種のタンパク質分解酵素impとemp遺伝子が不活化されたプレバチルス・チョウシネンシス菌株を作製した。emp遺伝子が不活化されたプレバチルス・チョウシネンシス菌株の作製は、相同組み換えによる遺伝子の不活化法に準じて行った。

#### 【0159】

まず、emp遺伝子不活化用ベクターの構築を行った。上記の実施例8-3に記載のemp P4プライマー（配列番号24）とアダプタープライマー（配列番号25）をプライマーに用い、また、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31のアダプターゲノムDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行い、emp遺伝子を部分的に含む約2.2kbpのDNA断片を増幅した。

#### 【0160】

次いで、このPCRにより増幅された約2.2kbpのDNA断片をpUC118のHincII制限酵素切断部位に挿入した。次いで、挿入したDNA断片の近傍にあるBamHI認識配列に同制限酵素により切り出されたエリスロマイシン耐性遺伝子を含むDNA断片を挿入した。更に、制限酵素HindIIIとPstIでemp遺伝子内部の220bpを除去後、このプラスミドのHindIII/PstI制限酵素切断部位にネオマイシン耐性遺伝子を含みFRT配列を両側に持つDNA断片を挿入することによりemp遺伝子不活化用ベクターを構築した。このemp遺伝子不活化用ベクターをpBlue-emp::Nm<sup>r</sup>とした。



## 【0161】

次いで、このemp遺伝子不活化用ベクターpBlue-emp::Nm<sup>r</sup>を用いてプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP2のemp遺伝子の不活化を行った。pBlue-emp::Nm<sup>r</sup>を用いたemp遺伝子の不活化、及び、emp遺伝子不活化株ゲノム上のネオマイシン耐性遺伝子の除去は、上記実施例7に記載のimp遺伝子不活化株の構築と同様の手順により行った。

## 【0162】

上記により得たimp遺伝子及びemp遺伝子が不活化されたプレビバチルス・チョウシネンシス菌株をプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3 (Brevibacillus choshinensis HPD31-SP3) と命名し、FERM BP-08479として国際寄託した。

## 【0163】

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3が孢子形成能を有しないことの確認)

## 【実施例10】

## 【0164】

(耐熱性試験)

以上により得たプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3が孢子形成能を有していないことを確認するため、実施例2と同様の方法により菌体の耐熱性試験を行った。試験の対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。その結果を表4に示す。

## 【0165】

(表4)

菌株	生菌数	
	80℃加温前	80℃加温後
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	$7.6 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	$2.1 \times 10^7$	0

## 【0166】

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31は、80℃、10分間の加温により全菌数の約3/4が死滅するのに対し、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3は同条件によって完全に死滅する。つまり耐熱性孢子を形成しないことが示された。

## 【実施例11】

## 【0167】

(D値の測定)

更に、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の孢子形成能を解析するため実施例3と同様の方法により菌体のD値の測定を行った。試験の対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。その結果を表5に示す。

## 【0168】

(表5)

	D値 (分間)		
	60℃	70℃	80℃
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	330	94	67
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	ND	ND	ND



## 【0169】

表5に示すとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31については、各温度域での菌体のD値を求めることができた。しかしながら、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3については、各温度域での試験開始後、1分間以内にすべての菌体が死滅したため、いずれの温度域でも菌体のD値を求めることができなかった。この結果は、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3が孢子体を形成しなかったためであると考えられる。

## 【0170】

以上の80℃、10分間の恒温試験及びD値の測定試験の結果により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3は、孢子形成能を有しないことが示された。

## 【0171】

(ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

## 【0172】

更に、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解活性の評価を行った。

まず、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087) (バチルス・ブレビスH102 (*Bacillus brevis* H102) (特開昭63-56277)) では分解が観察されないミルクカゼイン及びBSAに対して、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3が分解性を示さないことを確認した。

## 【実施例12】

## 【0173】

(ミルクカゼインの分解試験によるブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

5%、2%、1%のスキムミルクを含むTM寒天平板培地のそれぞれにブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を植菌した後、37℃で3日間培養を行い、ミルクカゼインの分解によるコロニーの周囲のハロー形成の有無を観察した。その結果、5%、2%、1%のスキムミルクを含む、それぞれのTM寒天培地のすべてにおいてハローは全く形成されなかった。

この結果により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3は、ミルクカゼインの分解性を有しないことが確認された。

## 【実施例13】

## 【0174】

(BSAの分解試験によるブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

## 【0175】

無菌濾過したBSA (Sigma A4503) 溶液を終濃度3.2mg/mlになるように添加したTM液体培地10mlにブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を接種し、37℃、200rpmで振とう培養した。

培養濾液を、培養開始後24時間、48時間、72時間の各々の時点で採取し、採取した各々の培養濾液に対して10000rpmで5分間遠心分離を行った。次いで、遠心分離により得られた培養上清画分625μlに0.5M Tris-HCl (pH6.8)

125μl、10% SDS 200μl、β-メルカプトエタノール 50μlを添加し、攪拌後沸騰水中で3分間熱処理を行った。更に熱処理後、0.05%BPBと70%グリセロールを含む0.0625M Tris-HCl (pH6.8) 0.1mlを加えSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。なお、SDS-PAGEは10%のアクリルアミド濃度で行なった。タンパク質の検出は、CBB (クーマシプリリアントブルー) による染色により行った。その結果、培養開始後24時間、48時間、72時間の全てにおいてBSAの分解によるバンドは観察されなかった。

この結果により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3はBSAの分

解性を有しないことが確認された。

#### 【0176】

更に、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性をゼラチン-PAGE法及びアゾカゼイン、アゾコールを用いた方法により測定した。対照にはブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31 (FERM BP-1087)を用いた。

#### 【実施例14】

#### 【0177】

(ゼラチン-PAGEによるHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の評価)

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれをTM液体培地で48時間培養した後、培養上清画分10 $\mu$ lをゼラチン-PAGEに供した。ゼラチン-PAGEは、Analytical Biochemistry 102, 196-202 (1980)の方法に従い行った。電気泳動後のゲルを10mM CaCl<sub>2</sub>を含む50mMトリス塩酸 (pH7.5) 緩衝液中に、37℃の恒温に16時間置くことによりゲル内のゼラチンを分解させた。恒温に置いた後、0.1%アミドブラックと30%メタノールと10%酢酸からなる染色液で30分間染色し、アミドブラックを含まない同液で脱色した。その結果を図2に示す。

#### 【0178】

図2に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31の培養上清画分では、約40kDaの移動度にタンパク質分解活性によりゼラチンが分解されたことを示すクリアバンドが確認されたが、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の培養上清画分においては、ゼラチンの分解を示すクリアバンドは全く認められなかった。

#### 【実施例15】

#### 【0179】

(アゾカゼインを使用したHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の測定)

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3をT2培地 (ペプトン1%、肉エキス0.5%、酵母エキス0.2%、グルコース1%) で、30℃、6日間振盪培養した。培養液を10,000rpm、10分間遠心分離し、得られた上清を活性測定用の試料とした。5gのアゾカゼインを0.1MのTris-HCl (pH8.0) 1Lに溶かし、基質溶液とした。次いで、0.1mlの上記基質溶液にこれと等量の試料を加え、37℃で5時間反応させた後、0.2mlの10%トリクロロ酢酸溶液を加えて反応を止めた。次いで、室温で20分間静置した後、15,000rpmで10分間遠心分離して上清画分を取り、0.4mlの0.5N NaOHを加え、440nmの吸光度を測定した。以上の実験の結果を表6に示す。なお、表6では5時間の反応で吸光度を10変化させる酵素活性を1 unitとした。

#### 【0180】

(表6)

菌株	酵素活性 (units/ml of culture supernatant)
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	0.12
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	ND

ND: 検出不可能 (0.001以下)

#### 【0181】

上記の表6に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-S

P3では、アゾカゼイン試薬を用いた活性測定でもタンパク質分解酵素活性を検出できなかった。プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の培養上清画分のタンパク質分解酵素活性はプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31に比べて1/120以下であった。

#### 【実施例16】

##### 【0182】

(アゾコールを使用したHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性の測定)  
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれをTM液体培地で48時間培養し、培養終了後、培養液を遠心、分画して得たそれぞれの培養上清画分をCentricon plus-20 (Biomax-5)により10倍に濃縮した。次いで、濃縮上清液300 $\mu$ lと等量の100mMトリス塩酸(pH7.5)、10mM CaCl<sub>2</sub>、1%アゾコール溶液を混合し、37℃の恒温で3時間、攪拌した。反応終了後、反応液を直ちに遠心分離し、培養上清液の520nmの吸光度を測定することにより、酵素活性を測定した。その結果を表7に示す。なお、37℃、1時間の反応で520nmの吸光度を0.01上昇させる酵素量を1 unitとした。

##### 【0183】

(表7)

菌株	酵素活性 (units/ml of culture supernatant)
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	33.2
プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	ND

ND: 検出不可能(0.1以下)

##### 【0184】

上記の表7に示されているとおり、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3では、アゾコール試薬を用いた活性測定でもタンパク質分解酵素活性を検出できなかった。プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の培養上清画分のタンパク質分解酵素活性はプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31に比べて1/330以下であった。

##### 【0185】

以上の実施例14から実施例16により、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞外のタンパク質分解酵素活性が、公知の菌株であるプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31より格段に低減していることが示された。

##### 【0186】

(プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内タンパク質分解酵素活性の評価)

次いで、本発明のプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内のタンパク質分解酵素活性をゼラチン-PAGE法及びアゾカゼインを用いた方法により評価を行った。なお、対照にはプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

#### 【実施例17】

##### 【0187】

(未変性条件下でのゼラチン-PAGEによるプレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3の細胞内タンパク質分解酵素活性の評価)

プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31、プレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれをTM液体培地で、30℃で48時間培養した。培養終了後、遠心分離により培養液から菌体を回収した後、超音波により菌体を破碎し、更に、遠心分離を行うことで細胞内画分を得た。そして、この細胞内画分を未変性条件下で電気泳動

に供した。未変性条件下の電気泳動は、細胞内画分  $10\mu\text{l}$  に終濃度  $50\text{mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 6.8$ )、 $10\%$  グリセロールを加え、 $0.1\%$  のゼラチンを含む  $10\%$  アクリルアミドゲルに供し、SDS を含まないトリス・グリシン緩衝液で  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\text{mA}$  の定電流で  $10$  時間泳動することにより行った。

#### 【0188】

電気泳動終了後、 $50\text{mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 7.5$ )、 $10\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$  緩衝液中でアクリルアミドゲルを  $37^\circ\text{C}$  の恒温に  $24$  時間置いた後、 $0.1\%$  アミドブラックと  $30\%$  メタノールと  $10\%$  酢酸からなる染色液で  $30$  分間染色し、アミドブラックを含まない同液で脱色した。その結果を図 3 に示す。

#### 【0189】

図 3 に示されているとおり、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 の細胞内画分では、タンパク質分解活性によりゼラチンが分解されたことを示すクリアバンドが確認されたが、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 の細胞内画分においては、ゼラチンの分解を示すクリアバンドは全く認められなかった。

#### 【実施例 18】

##### 【0190】

(アゾカゼインを使用したプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 の細胞内のタンパク質分解酵素活性の測定)

実施例 17 と同様の方法で得たプレバチルス・チョウシネンシス HPD31 及びプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3、それぞれの細胞内画分  $200\mu\text{l}$  と酵素反応液 ( $100\text{mM}$  トリス塩酸 ( $\text{pH} 7.5$ )、 $0.2\%$  アゾカゼイン、 $10\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ )  $400\mu\text{l}$  を混和し、 $37^\circ\text{C}$  の恒温に  $1.5$  時間置いた後、終濃度  $2.5\%$  の TCA を添加することにより反応を停止させた。次いで、反応液を遠心分離後、上清液の  $440\text{nm}$  の吸光度を測定した。反応に用いた粗酵素液の総タンパク質量は、BSA を標準とする Bradford 法により定量した。以上の結果を表 8 に示す。なお、 $37^\circ\text{C}$ 、 $1$  時間の反応において  $440\text{nm}$  の吸光度を  $0.01$  上昇させる酵素量を  $1\text{ unit}$  とした。

##### 【0191】

(表 8)

菌株	比活性(units/mg protein)
プレバチルス・チョウシネンシス HPD31	41.5( $\pm 1$ )
プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3	5.2( $\pm 1.4$ )

##### 【0192】

上記の表 8 が示すとおり、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 では、細胞内のタンパク質分解酵素活性が、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 に比べ約  $1/8$  に低下していた。

##### 【0193】

以上の実施例 17 及び実施例 18 により、本発明のプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 の細胞内のタンパク質分解酵素活性は、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 より格段に低減していることが示された。

##### 【0194】

(プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 による組換えタンパク質の分泌生産)

更に、本発明のプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 を宿主に用いた組換えタンパク質の生産性及び分解性の評価試験を、まず、組換えタンパク質が分泌生産される場合について行った。

##### 【0195】

この組換えタンパク質が分泌生産される場合の生産性及び分解性の評価試験は、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主として分泌生産を行った場合には、その一部が分解されていたタンパク質の生産を行うことにより行った。

ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主として分泌生産を行った場合にその一部分が分解されていたタンパク質としては、ブタ由来IL-1 $\beta$ 成熟体 (EMBL accession X74568)、大腸菌K12株由来マルトース結合タンパク質 (maltose binding protein) 成熟体 (EMBL accession AAB59056)、ウシ由来マクロファージコロニー刺激因子成熟体 (GenBank accession NM\_174026.1)、豚丹毒抗原タンパク質の一部分で豚丹毒抗原性を有するEN2 (特開2000-279179)、及び、大腸菌O157:H7株由来のインチミン (SWISS-PROT accession P43261) の一部分でインチミン抗原性を有するポリペプチド (Intimin (339-575)) を用いた。なお対照にはブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

#### 【実施例19】

##### 【0196】

(ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるブタIL-1 $\beta$ タンパク質の分泌生産)

ブタ由来IL-1 $\beta$ 成熟体 (EMBL accession X74568) (以下ブタIL-1 $\beta$ ) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にNcoI認識配列とシグナルペプチドの一部をコードする配列を付加したセンスプライマー (配列番号26:図26) とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHind III認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号27:図27) を用いてブタ由来IL-1 $\beta$ cDNAを鋳型にPCRを行った。更に、PCRで増幅されたDNA断片を制限酵素NcoIおよびHind IIIで処理し、pNY301ベクターのNcoI/Hind III制限酵素切断部位に挿入することによりブタIL-1 $\beta$ 分泌生産用ベクターを構築した。このブタIL-1 $\beta$ 分泌生産用ベクターをpNY301-pIL-1 $\beta$ とした。

##### 【0197】

次いで、このpNY301-pIL-1 $\beta$ をエレクトロポレーション法によりブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30℃、90時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得たそれぞれの培養上清画分を10-25%濃度勾配のアクリルアミドゲル電気泳動に供した。電気泳動終了後、セミドライ式タンパク質転写装置によってタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。次いで、定法に従い、転写膜を抗pig IL-1 $\beta$ 抗体を用いたウエスタンブロット解析に供しブタIL-1 $\beta$ の検出を行った。

##### 【0198】

その結果、図5に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、ブタIL-1 $\beta$ の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、本発明のブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、ブタIL-1 $\beta$ の分解を示すバンドは認められなかった。

##### 【0199】

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、ブタIL-1 $\beta$ に相当するバンドのデンストメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたブタIL-1 $\beta$ の定量を行った。この測定の結果を図4及び表9に示す。(表9)

宿主菌株	培養液中のブタIL-1 $\beta$ の蓄積量 (mg/l)
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	30

## 【0200】

表9に示されているとおり、ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中のブタIL-1 $\beta$ の蓄積量は、ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5を宿主に用いた場合に比べ約2.5倍以上に増加していた。

## 【実施例20】

## 【0201】

(ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3による大腸菌MBPの分泌生産)

大腸菌K12株由来マルトース結合タンパク質 (maltose binding protein (MBP)) 成熟体 (EMBL accession AAB59056) (以下大腸菌MBP) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にPst I 認識配列を付加したセンスプライマー (配列番号28: 図28) とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHind III 認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号29: 図29) を用いて大腸菌K12株ゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。更に、PCRで増幅されたDNA断片を制限酵素Pst I とHind III で処理し、pNY301ベクターのPst I /Hind III 制限酵素切断部位に挿入することにより大腸菌MBP分泌生産用ベクターを構築した。この大腸菌MBP分泌生産用ベクターをpNY301-MBPとした。

## 【0202】

次いで、このpNY301-MBPをエレクトロポレーション法により、ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30℃、72時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンブロット分析に供した。その結果、ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、大腸菌MBPの分解を示す顕著なバンドが確認されたが、本発明のブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、大腸菌MBPの分解を示すバンドは認められなかった。

## 【0203】

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、大腸菌MBPに相当するバンドのデンストメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積された大腸菌MBPの定量を行った。この測定の結果を表10に示す。

## 【0204】

(表10)

宿主菌株	培養液中の大腸菌MBPの蓄積量 (mg/l)
ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31	500
ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	900

## 【0205】

表10に示されているとおり、ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中の大腸菌MBPの蓄積量は、ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

## 【実施例21】

## 【0206】

(ブレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるウシM-CSFの分泌生産)

ウシ由来マクロファージコロニー刺激因子成熟体 (GenBank accession NM\_174026.1) (以下ウシM-CSF) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にBamHI認識配列を付加したセンスプライマー (配列番号30: 図30) とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHindIII認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号31: 図31) を用いてウシM-CSF cDNAを鋳型にPCRを行った。更に、PCRで増幅されたDNA断片を制限酵素BamHIとHindIIIで処理し、pNY301ベクターのBamHI/HindIII制限酵素切断部位に挿入することによりウシM-CSF分泌生産用ベクター構築をした。このウシM-CSF分泌生産用ベクターをpNY301-M-CSFとした。

#### 【0207】

次いで、このpNY301-M-CSFをエレクトロポレーション法によりブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30℃、72時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンブロット分析に供した。その結果、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、ウシM-CSFの分解を示すバンドが確認されたが、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、ウシM-CSFの分解を示すバンドは認められなかった。

#### 【0208】

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、ウシM-CSFに相当するバンドのデンストメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表11に示す。

#### 【0209】

(表11)

宿主菌株	培養液中のウシM-CSFの蓄積量 (mg/l)
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31	50
ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	150

#### 【0210】

表11に示されているとおり、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中のウシM-CSFの蓄積量は、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約3倍に増加していた。

#### 【実施例22】

##### 【0211】

(ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるEN2の分泌生産)

豚丹毒抗原タンパク質の一部であるEN2を発現するプラスミドベクターpNH300en2 (特開2000-279179) をエレクトロポレーション法により、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31及びブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築し、更に、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30℃、90時間培養した。

##### 【0212】

培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンブロット分析に供した。その結果、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、EN2の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、ブレビバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、EN2の分解を示すバンドは認められなかった。

##### 【0213】

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、EN2に相当するバンドのデンストメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表12に示す。

## 【0214】

(表12)

宿主菌株	培養液中のEN2の蓄積量 (mg/l)
プレバチルス・チョウシネンシスHPD31	400
プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	750

## 【0215】

表12に示されているとおり、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中のEN2の蓄積量は、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

## 【実施例23】

## 【0216】

(プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるIntimin (339-575)の生産)

成熟型インチミンの339番目のアミノ酸配列に相当するDNA配列にBamHIの認識配列を付加したセンスプライマー (配列番号32:図32) と575番目近傍のアミノ酸配列に対応するDNA配列にHind IIIの認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号33:図33) を用いてインチミン遺伝子を鋳型にPCRを行った。更に、PCRで増幅したDNA断片を制限酵素Hind IIIとBamHIで処理した後、pNY301のBamHI/Hind III制限酵素切断部位に挿入することにより大腸菌O157:H7株由来のインチミン (SWISS-PROT accession P43261) のアミノ酸配列の339番目から575番目に相当する部分のポリペプチド (以下Intimin (339-575)) を発現するプラスミドベクターを構築した。このIntimin (339-575) 分泌生産用ベクターをpNY301-Intiminとした。

## 【0217】

次いで、このpNY301-Intiminをエレクトロポレーション法により、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31及びプレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。更に、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30℃、90時間培養した。培養終了後、培養液を遠心、分画して得た培養上清画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウェスタンブロット分析に供した。その結果、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、Intimin (339-575) の分解を示す複数の顕著なバンドが確認されたが、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、Intimin (339-575) の分解を示す顕著なバンドは認められなかった。

## 【0218】

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、Intimin (339-575) に相当するバンドのデンストメトリーを測定することにより、培養液中に蓄積されたIntimin (339-575) の定量を行った。この測定の結果を表13に示す。

## 【0219】

(表13)

宿主菌株	培養液中のIntimin (339-575)の蓄積量 (mg/l)
------	-----------------------------------



プレバチルス・チョウシネンシスHPD31	100
プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	200

## 【0220】

表13に示されているとおり、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産された培養液中のIntimin(339-575)の蓄積量は、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

## 【0221】

以上の実施例19から実施例23により、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、その生産された一部が分解されていた組換えタンパク質の分泌生産をプレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて行った場合、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合より該タンパク質の蓄積量が増加することが示された。

## 【0222】

これらの結果は、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、分泌生産されたタンパク質の分解が顕著に抑制されたためと考えられる。

## 【0223】

(プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3による組換えタンパク質の細胞内への蓄積生産)

更に、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた組換えタンパク質の生産性及び分解性の評価試験を、組換えタンパク質が分泌生産される場合ではなく、生産された組換えタンパク質が菌体内に蓄積される場合について行った。この評価試験は、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いて菌体内への蓄積生産を行った場合に、その一部が菌体内で分解されていたタンパク質であるブタ由来インターフェロン $\gamma$ (PIR accession S10513)及びイヌ由来インターフェロン $\beta$ (GenBank accession E11229)の生産を行うことにより行った。

## 【0224】

なお、対照にはプレバチルス・チョウシネンシスHPD31を用いた。

## 【実施例24】

## 【0225】

(プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3による組換えブタ由来インターフェロン $\gamma$ の細胞内への蓄積生産)

ブタ由来インターフェロン $\gamma$ 成熟体(PIR accession S10513)(以下ブタIFN $\gamma$ )のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にNcoI認識配列とMetAlaをコードする配列からなるccatggct配列を付加したセンスプライマー(配列番号34:図34)とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHindIII認識配列を付加したアンチセンスプライマー(配列番号35:図35)を用いてブタ由来インターフェロン $\gamma$ cDNAを鋳型にPCRを行った。更に、PCRで増幅したDNA断片を制限酵素NcoIとHindIIIで処理した後、pNY301ベクターの翻訳開始メチオニン上に存在するBspHI/HindIII制限酵素切断部位に挿入することによりブタIFN $\gamma$ 発現用ベクターを構築した。このブタIFN $\gamma$ 発現用ベクターをpNY301-pIFN $\gamma$ とした。このpNY301-pIFN $\gamma$ は分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列を有していないため生産されたブタIFN $\gamma$ は細胞内に蓄積される。

## 【0226】

次いで、このpNY301-pIFN $\gamma$ をエレクトロポレーション法によりプレバチルス・チョウシネンシスHPD31及びプレバチルス・チョウシネンシスHPD31

ーSP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。また、対照として用いるためブタIFN- $\gamma$ 遺伝子が組み込まれていないpNY301を導入したプレバチルス・チョウシネンシスHPD31/pNY301も構築した。

#### 【0227】

更に、これらの形質転換体及びプレバチルス・チョウシネンシスHPD31/pNY301を、それぞれTM液体培地で30℃、72時間培養した。培養終了後、遠心分離により培養液から菌体を回収した後、超音波により菌体を破碎し、更に、遠心分離を行い細胞内画分を得た。次いで、この細胞内画分を実施例19と同様の手順によりSDS-PAGE及びウエスタンブロット分析に供した。

#### 【0228】

その結果、図6に示されているように、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合には、ブタIFN- $\gamma$ の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いた場合には、ブタIFN- $\gamma$ の分解を示すバンドは認められなかった。

#### 【0229】

また、電気泳動後のゲルに対してCBB染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、ブタIFN- $\gamma$ に相当するバンドのデンシトメトリーを測定することにより細胞内に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表14に示す。

#### 【0230】

(表14)

宿主菌株	細胞内のブタIFN- $\gamma$ の蓄積量 (mg/l)
プレバチルス・チョウシネンシスHPD31	30
プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3	60

#### 【0231】

表14に示されているとおり、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3を宿主に用いて生産されたブタIFN- $\gamma$ の細胞内の蓄積量は、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31を宿主に用いた場合に比べ約2倍に増加していた。

#### 【実施例25】

#### 【0232】

(プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3によるイヌ由来インターフェロン- $\beta$ の細胞内への蓄積生産)

イヌ由来インターフェロン- $\beta$ 成熟体 (GenBank accession E11229) (以下イヌIFN- $\beta$ ) のN末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にBspHI認識配列を付加したセンスプライマー (配列番号36:図36) とC末端アミノ酸残基をコードするDNA配列にHindIII認識配列を付加したアンチセンスプライマー (配列番号37:図37) を用いてイヌIFN- $\beta$  cDNAを鋳型にPCRを行った。更に、PCRで増幅したDNA断片を制限酵素BspHI及びHindIIIで処理した後、pNY301ベクターの翻訳開始メチオニン上に存在するBspHI/HindIII制限酵素切断部位に挿入することによりイヌIFN- $\beta$ 発現用ベクターを構築した。このイヌIFN- $\beta$ 発現用ベクターをpNY301-cIFN- $\beta$ とした。このpNY301-cIFN- $\beta$ は分泌シグナルペプチドをコードするDNA配列を有していないため生産されたイヌIFN- $\beta$ は細胞内に蓄積される。

#### 【0233】

次いで、このpNY301-cIFN- $\beta$ をエレクトロポレーション法によりプレバチルス・チョウシネンシスHPD31、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-SP3のそれぞれに導入することにより形質転換体を構築した。次いで、これらの形質転換体を、それぞれTM液体培地で30℃、72時間培養した。培養終了後、遠心分離によ

り培養液から菌体を回収した後、超音波により菌体を破碎し、更に、遠心分離を行うことで細胞内画分を得た。次いで、この細胞内画分を実施例 21 と同様の手順により SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析に供した。その結果、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 を宿主に用いた場合には、イヌ IFN- $\beta$  の分解を示す顕著なバンドが確認されたが、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 を宿主に用いた場合には、イヌ IFN- $\beta$  の分解を示すバンドは認められなかった。

#### 【0234】

また、電気泳動後のゲルに対して CBB 染色を行い、タンパク質バンドの検出を行った後、イヌ IFN- $\beta$  に相当するバンドのデンストメトリーを測定することにより、細胞内に蓄積されたタンパク質の定量を行った。この測定の結果を表 15 に示す。

#### 【0235】

(表 15)

宿主菌株	細胞内のイヌ IFN- $\beta$ の蓄積量 (mg/l)
プレバチルス・チョウシネンシス HPD31	50
プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3	80

#### 【0236】

表 15 に示されているとおり、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 を宿主に用いて生産されたイヌ IFN- $\beta$  の細胞内の蓄積量は、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 を宿主に用いた場合に比べ約 1.6 倍に増加していた。

#### 【0237】

上記の実施例 24 及び実施例 25 により、本発明のプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 を宿主に用いて組換えタンパク質の生産を行った場合、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 を宿主に用いた場合に比べ、該タンパク質の蓄積量が増加することが示された。これらの結果は、細胞内タンパク質分解酵素遺伝子 *imp* の不活化により細胞内に蓄積された組換えタンパク質が顕著に抑制されたためであると考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0238】

【図 1】本発明のプレバチルス・チョウシネンシスの作製に用いた相同組み換えによる遺伝子不活化法の概略を示す図である。

【図 2】ゼラチン-PAGE による、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 の培養上清画分のタンパク質分解酵素活性の測定の結果を示す図面代用写真である。

【図 3】ゼラチン-PAGE による、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31、プレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 の細胞内画分のタンパク質分解酵素活性の測定の結果を示す図面代用写真である。

【図 4】プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 及びプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 を宿主に用いた遺伝子組換えにより分泌生産されたブタ IL-1 $\beta$  に対する CBB 染色の結果を示す図面代用写真である。

【図 5】プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 及びプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 を宿主として用いた遺伝子組換えにより分泌生産されたブタ IL-1 $\beta$  に対するウエスタンブロットの結果を示す図面代用写真である。

【図 6】プレバチルス・チョウシネンシス HPD31 及びプレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 を宿主に用いた遺伝子組換えにより、細胞内に蓄積生産されたブタ IFN- $\gamma$  に対するウエスタンブロットの結果を示す図面代用写真である。

【図 7】胞子形成関連遺伝子 *hos* の DNA 塩基配列 (上段) 及びそれに対応するア

ミノ酸配列（下段）を示す。

【図 8】 同上続きを示す。

【図 9】 細胞外タンパク質分解酵素 EMP のアミノ酸配列（下段）及びそれをコードする遺伝子 emp の DNA 配列（上段）を示す。

【図 10】 同上続きを示す。

【図 11】 同上続きを示す。

【図 12】 細胞内タンパク質分解酵素 IMP のアミノ酸配列（下段）及びそれをコードする遺伝子 imp の DNA 配列（上段）を示す。

【図 13】 同上続きを示す。

【図 14】 プライマー Hos P1、Hos P2、Hos P3、Hos P4 を示す。

【図 15】 プライマー imp P1、imp P2 を示す。

【図 16】 プライマー flp P1 を示す。

【図 17】 プライマー flp P2 を示す。

【図 18】 プライマー flp P3 を示す。

【図 19】 プライマー flp P4 を示す。

【図 20】 プライマー flp P5 を示す。

【図 21】 プライマー flp P6 を示す。

【図 22】 プライマー flp P7 を示す。

【図 23】 プライマー flp P8 を示す。

【図 24】 プライマー emp P1、emp P2 の塩基配列及びアミノ酸配列データを示す。

【図 25】 プライマー emp P3、emp P4、アダプタープライマーを示す。

【図 26】 実施例 19 におけるセンスプライマーを示す。

【図 27】 同アンチセンスプライマーを示す。

【図 28】 実施例 20 におけるセンスプライマーを示す。

【図 29】 同アンチプライマーを示す。

【図 30】 実施例 21 におけるセンスプライマーを示す。

【図 31】 同アンチセンスプライマーを示す。

【図 32】 実施例 23 におけるセンスプライマーを示す。

【図 33】 同アンチセンスプライマーを示す。

【図 34】 実施例 24 におけるセンスプライマーを示す。

【図 35】 同アンチセンスプライマーを示す。

【図 36】 実施例 25 におけるセンスプライマーを示す。

【図 37】 同アンチセンスプライマーを示す。

【配列表フリーテキスト】

【0239】

<110> Higeta Shoyu Co., Ltd.

<120> Novel Brevibacillus chosinensis and Producing Method of Protein by Using Thereof as Host

<130> 6734<BR>

<141> 2003-11-11

<160> 37

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 756

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brevibacillus choshinensis

&lt;400&gt; 1

```

atgggtgccg atatcaaaaa tgcgagtcaa ccatctctga ccaatgacca agtgaaagat      60
ttgatagcca agagccaagc tggcgatacg gatgcacgtg agcttctcgt gaatagcaat      120
atcagactgg tctggtccgt cgtccagcgc tttatcaacc gcgggtatga agcggatgat      180
ttgtttcaga tcggttgcat tggcttgctc aaggccgttg acaagttcga tctttcgtac      240
gatgtgagat tttcgacctg tgcggtgcca atgatcatcg gagaaattca acgctttttg      300
cgcgatgacg gtacgggtta ggtcagtcga tcgttaaaag aaacagcgaa taagggtgcgg      360
cgatcaaagg atgaattgta caagcaattc ggccgtgccc ccacgatcgc agaagtggca      420
gaagcagtgg gaatcacgcc ggaggaagta gtctttgcgc aagaggcaag cagagcgcct      480
tcctccatcc atgagaccgt ttttgaaaat gacggcgatc ccatcacact gatcgatcag      540
atagcggatg aagggtgtgaa caagtgggtt gagaaaattg ccttgaagga cgccatcagc      600
aggctgagcg agcgtgagca gctcatcgtc tacctgcgct attacaagga tcagacacag      660
tctgaggtag cagagcgtct agggatttcg cagggtccagg tctcgcgtct ggaaaagcgt      720
atcctgctaa cgatcaagga gcaaattgaa cattag      756

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 251

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Brevibacillus choshinensis

&lt;400&gt; 2

```

Met Gly Ala Asp Ile Lys Asn Ala Ser Gln Pro Phe Leu Thr Asn Asp
                    5                      10                      15
Gln Val Lys Asp Leu Ile Ala Lys Ser Gln Ala Gly Asp Thr Asp Ala
                    20                      25                      30
Arg Glu Leu Leu Val Asn Ser Asn Ile Arg Leu Val Trp Ser Val Val

```

35 40 45  
Gln Arg Phe Ile Asn Arg Gly Tyr Glu Ala Asp Asp Leu Phe Gln Ile  
50 55 60  
Gly Cys Ile Gly Leu Leu Lys Ala Val Asp Lys Phe Asp Leu Ser Tyr  
65 70 75 80  
Asp Val Arg Phe Ser Thr Tyr Ala Val Pro Met Ile Ile Gly Glu Ile  
85 90 95  
Gln Arg Phe Leu Arg Asp Asp Gly Thr Val Lys Val Ser Arg Ser Leu  
100 105 110  
Lys Glu Thr Ala Asn Lys Val Arg Arg Ser Lys Asp Glu Leu Tyr Lys  
115 120 125  
Gln Phe Gly Arg Ala Pro Thr Ile Ala Glu Val Ala Glu Ala Val Gly  
130 135 140  
Ile Thr Pro Glu Glu Val Val Phe Ala Gln Glu Ala Ser Arg Ala Pro  
145 150 155 160  
Ser Ser Ile His Glu Thr Val Phe Glu Asn Asp Gly Asp Pro Ile Thr  
165 170 175  
Leu Ile Asp Gln Ile Ala Asp Glu Gly Val Asn Lys Trp Phe Glu Lys  
180 185 190  
Ile Ala Leu Lys Asp Ala Ile Ser Arg Leu Ser Glu Arg Glu Gln Leu  
195 200 205  
Ile Val Tyr Leu Arg Tyr Tyr Lys Asp Gln Thr Gln Ser Glu Val Ala  
210 215 220  
Glu Arg Leu Gly Ile Ser Gln Val Gln Val Ser Arg Leu Glu Lys Arg  
225 230 235 240  
Ile Leu Leu Thr Ile Lys Glu Gln Ile Glu His  
245 250

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2265

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Brevibacillus choshinensis

&lt;400&gt; 3

gtgaacgcag tgaagaaagg caagaagcta ttatccatcc tattttcttc ctcaactggtc 60  
ctgagcggca ttgcggcggt tccagcgaca gggatggcca agtcaaagga caagccgccg 120  
cttgaagtgg atttgccac agtgaacatg gatcgtttgg ttaaagcctt gatcgaccaa 180  
ggtgaaatcg acgaggacgc cgaccaggaa gagatcaaca aagctgtgga gaagtttttg 240  
agagacaaga aagtccccca cggcattgat gactccagct ccttcgggaa aaaagcaagc 300  
aaaaccacgc tttcggcagt atcaaaggca gcaagcaaag tatccaagct caaagatgac 360  
aagcaagtgc gcgcttccaa gcgggtacat acggataatc tgggtgattgc cctggtcgag 420  
ttcaatgata tggagcacia ccagggtgcca aaacaaagcg attccttgtg gacggcagac 480  
ttcgacaaaa agcactacga ggaaatgctg ttcgatcgta aaggctatac gactcctgaa 540  
gggataagca tgaccacgat ggccaagtac tactacgagc aatcgggtga gacatggacc 600  
glggatgggg llglcaelcc glggllgac l gccgaaaaag alaagaaall clacggllga 660  
aacgatgaaa acggcaacga tgccaacca cgcgatctgg tcgtcgagac actggaatct 720  
gtaggggatg ccatcaaggg tcatgaagaa gaatacgacc aacgcgaccc gtatgacttg 780  
gatggagaca gcgatctgat ggagccggat ggcatgctgg acaacctgat gctggttcac 840  
tccggtattg gtgaagagac tggggaagat gcggatgcga tctggtctca ccgctggact 900  
ctgaaaaagc cgacagaaat tccaggcacc agcctgaaag cttaagacta catgattcag 960  
cctgaagatg gcgcaccggc cgtattcgca catgaatacg gacacaacct gggactgcc 1020  
gatctgtatg acacgacaag actgggacat gattcgccgg ttggcgcatg gtcgctgatg 1080  
tcttcgggaa gccatacagg taagatcttc caaacccaac caaccggatt tgatccttgg 1140  
tccaaaatga tgctgcagga aatgtatggg ggcaagtgga ttgagccgca agtcatcaat 1200  
tacgaagacc tgaaaaaacg gaaaaagcag gcttcgctct acgatggcag cagcctcgat 1260  
gaagalggca aaglcaccaa gclgaalalg ccgcaaglag agaagacacc gccggllcaa 1320  
ccgaaagacg gcgattattc ttacttctcc gatgagggcg acaatctgaa cacgaagatg 1380  
acttcggaag tgatcgacct gacaggcgcc agctccgcat cgatgagctt cgactcctgg 1440  
agagcgatcg agaccgggta cgactacctg tacgtgaacg tgattgatgt cgactcaggt 1500  
gagagcacia cagtaaaaaga gtacgatgac gaaaccaaag gctgggataa ggaagaaatc 1560

agcctgaacg atttcgctgg caaaaagatt caagtcgagt tcaactacgt gacggatggc 1620  
 ggcttggcga tgtccggctt ctatctggat aattttgcag tcacagcaga cggcgaagta 1680  
 gtcttctcgg atgatgcaga aggcgaccag aagtttgatc tggatggatt catccatttc 1740  
 gacggcgaag gcaaaatgta cgacgcgtac tacctggtag agctgcgctc ccatgaaggc 1800  
 gtggacgagg gtctgaaata cttccgcgcg aatgacacat tcttcacgta tgatccaggt 1860  
 ctggtgatct ggtactacga tggacgcttt ggcaaaacgc aagacaacaa caccagcaac 1920  
 catccaggct acggcatgct gggcgtagtc gatgcgcatc aggaagtctg ttactggaat 1980  
 aacgatgagg gcaacgagga ggccattgcc gactcccgtt accaagtga ccatgcggca 2040  
 ttcagcccga acaaaacctc cggcatggat ctcgactaca ttctcggcac gatggattac 2100  
 gagccgcgca aaggcallac cglallcaaa gacaglgalg allacacgal gccggaagll 2160  
 ccggaaatcg gaaaaatcct gccgaagatc ggtctgcaaa tcaaattaat tcgtgtgtcc 2220  
 aagaaattca cgaacgcaca ggtcgagttc tccatcaaaa aataa 2265

<210> 4

<211> 754

<212> PRT

<213> Brevibacillus choshinensis

<400> 4

Val Asn Ala Val Lys Lys Gly Lys Lys Leu Leu Ser Ile Leu Phe Ser

5 10 15

Ser Ser Leu Val Leu Ser Gly Ile Ala Ala Val Pro Ala Thr Gly Met

20 25 30

Ala Lys Ser Lys Asp Lys Pro Pro Leu Glu Val Asp Leu Ser Thr Val

35 40 45

Asn Met Asp Arg Leu Val Lys Ala Leu Ile Asp Gln Gly Glu Ile Asp

50 55 60

Glu Asp Ala Asp Gln Glu Glu Ile Asn Lys Ala Val Glu Lys Phe Leu

65 70 75 80

Arg Asp Lys Lys Val Pro His Gly Ile Asp Asp Ser Ser Ser Phe Gly

85 90 95



Lys Lys Ala Ser Lys Thr Gln Leu Ser Ala Val Ser Lys Ala Ala Ser  
100 105 110  
Lys Val Ser Lys Leu Lys Asp Asp Lys Gln Val Arg Ala Ser Lys Arg  
115 120 125  
Val His Thr Asp Asn Leu Val Ile Ala Leu Val Glu Phe Asn Asp Leu  
130 135 140  
Glu His Asn Gln Val Pro Lys Gln Ser Asp Ser Leu Trp Thr Ala Asp  
145 150 155 160  
Phe Asp Gln Lys His Tyr Glu Glu Met Leu Phe Asp Arg Lys Gly Tyr  
165 170 175  
Thr Thr Pro Glu Gly Ile Ser Met Thr Thr Met Ala Lys Tyr Tyr Tyr  
180 185 190  
Glu Gln Ser Gly Glu Thr Trp Thr Val Asp Gly Val Val Thr Pro Trp  
195 200 205  
Leu Thr Ala Glu Lys Asp Lys Lys Phe Tyr Gly Gly Asn Asp Glu Asn  
210 215 220  
Gly Asn Asp Ala Asn Pro Arg Asp Leu Val Val Glu Thr Leu Glu Ser  
225 230 235 240  
Val Gly Asp Ala Ile Lys Gly His Glu Glu Glu Tyr Asp Gln Arg Asp  
245 250 255  
Pro Tyr Asp Leu Asp Gly Asp Ser Asp Leu Met Glu Pro Asp Gly Met  
260 265 270  
Leu Asp Asn Leu Met Leu Val His Ser Gly Ile Gly Glu Glu Thr Gly  
275 280 285  
Glu Asp Ala Asp Ala Ile Trp Ser His Arg Trp Thr Leu Lys Lys Pro  
290 295 300  
Thr Glu Ile Pro Gly Thr Ser Leu Lys Ala Tyr Asp Tyr Met Ile Gln  
305 310 315 320  
Pro Glu Asp Gly Ala Pro Gly Val Phe Ala His Glu Tyr Gly His Asn

325 330 335  
Leu Gly Leu Pro Asp Leu Tyr Asp Thr Thr Arg Leu Gly His Asp Ser  
340 345 350  
Pro Val Gly Ala Trp Ser Leu Met Ser Ser Gly Ser His Thr Gly Lys  
355 360 365  
Ile Phe Gln Thr Gln Pro Thr Gly Phe Asp Pro Trp Ser Lys Met Met  
370 375 380  
Leu Gln Glu Met Tyr Gly Gly Lys Trp Ile Glu Pro Gln Val Ile Asn  
385 390 395 400  
Tyr Glu Asp Leu Lys Lys Arg Lys Lys Gln Ala Ser Leu Tyr Asp Gly  
405 410 415  
Ser Ser Leu Asp Glu Asp Gly Lys Val Ile Lys Leu Asn Met Pro Gln  
420 425 430  
Val Glu Lys Thr Pro Pro Val Gln Pro Lys Asp Gly Asp Tyr Ser Tyr  
435 440 445  
Phe Ser Asp Glu Gly Asp Asn Leu Asn Thr Lys Met Thr Ser Glu Val  
450 455 460  
Ile Asp Leu Thr Gly Ala Ser Ser Ala Ser Met Ser Phe Asp Ser Trp  
465 470 475 480  
Arg Ala Ile Glu Thr Gly Tyr Asp Tyr Leu Tyr Val Asn Val Ile Asp  
485 490 495  
Val Asp Ser Gly Glu Ser Thr Thr Val Lys Glu Tyr Asp Asp Glu Thr  
500 505 510  
Lys Gly Trp Asp Lys Glu Glu Ile Ser Leu Asn Asp Phe Ala Gly Lys  
515 520 525  
Lys Ile Gln Val Glu Phe Asn Tyr Val Thr Asp Gly Gly Leu Ala Met  
530 535 540  
Ser Gly Phe Tyr Leu Asp Asn Phe Ala Val Thr Ala Asp Gly Glu Val  
545 550 555 560

Val Phe Ser Asp Asp Ala Glu Gly Asp Gln Lys Phe Asp Leu Asp Gly  
565 570 575

Phe Ile His Phe Asp Gly Glu Gly Lys Met Tyr Asp Ala Tyr Tyr Leu  
580 585 590

Val Glu Leu Arg Ser His Glu Gly Val Asp Glu Gly Leu Lys Tyr Phe  
595 600 605

Arg Arg Asn Asp Thr Phe Phe Thr Tyr Asp Pro Gly Leu Val Ile Trp  
610 615 620

Tyr Tyr Asp Gly Arg Phe Gly Lys Thr Gln Asp Asn Asn Thr Ser Asn  
625 630 635 640

His Pro Gly Tyr Gly Met Leu Gly Val Val Asp Ala His Gln Glu Val  
645 650 655

Arg Tyr Trp Asn Asn Asp Glu Gly Asn Glu Glu Ala Ile Ala Asp Ser  
660 665 670

Arg Tyr Gln Val Asn Asp Ala Ala Phe Ser Pro Asn Lys Thr Ser Gly  
675 680 685

Met Asp Leu Asp Tyr Ile Leu Gly Thr Met Asp Tyr Glu Pro Leu Lys  
690 695 700

Gly Ile Thr Val Phe Lys Asp Ser Asp Asp Tyr Thr Met Pro Glu Val  
705 710 715 720

Pro Glu Ile Gly Lys Ile Leu Pro Lys Ile Gly Leu Gln Ile Lys Leu  
725 730 735

Ile Arg Val Ser Lys Lys Phe Thr Asp Ala Gln Val Glu Phe Ser Ile  
740 745 750

Lys Lys  
754

<210> 5

<211> 1362

<212> DNA

<213> Brevibacillus choshinensis

<400> 5

atgaaccatc ctgattttcg cgatctaccc gcctgcatgg aagacgtaac cctcgctgcc 60  
ctggacgagt acaactgggcc accagatccg accgaatacc aatcattgta tggacgcttg 120  
caagaggttg ccgaaactct cctccgctc tatcgggagc atgtgtatca cctttttctt 180  
caagcgatgg acaagttgtc tgagtcagga ttgtgcgcaga tgctccgctc agatcctcaa 240  
aaagagcga aagccggctt gttttgcgat atcgcacagg ccattctgca aaacggcgaa 300  
gcgtatgaac gcgatgccac ggatgccttt caggaagtag tcagcgattt gtacgacggt 360  
ttttaagcg aggaagacag gagtggcacc aaaccgctg atgaaagctt gattgctcct 420  
ctggtcacaaat ggggacgccc gcaattcgga ccttatacgt ggacagctga agccgctgcc 480  
cattttggca tcaagacggg cattgtcaat ttgccccgg caaacgccc cctgggtctg 540  
ctcgctgggt ctgcattagg tcacgaaacg gctggacacg acattctcca cgccgacacc 600  
ggtttgcttg gagaactgca gcaaaccgtc tatgacgctt tgtttgatga gcttcacaat 660  
cggacgctgg cggactactg gtcgctccga atcgacgaga ctgcctccga cgttttggga 720  
atcctgaaca ccggccccgc tgcagggatt ggactgattg gatatttccg cggccttaat 780  
aaggcgata cccggacaagc aacactgcgg aatacagggc cacagaatga cccacatcca 840  
gcagacatct tgcgcgggta tcttgctgct gagactgctc gtctgctgca ttttgacaac 900  
gcattccgact gggcacaggc acttctcgag gaaaccaggc gtgatcttaa aggcattaca 960  
ataggcagag cctcttttga tgcagaaacc gctcaaaaat ctgctgccat tgtcgctcgc 1020  
acaattatgg aagcacgcct gctcagctcga gaaggctcat ccctcgggca aattcaaaac 1080  
tggcacaacg aggatgaacg aatcggtcag gaaattcgct cccattttac aggttcacctg 1140  
accgtgcaag accgcattgt ttcgggtatg tatgctgcgc atgtcgctggc agcagccgtc 1200  
caagcagccg lllcaggaga galggalacc lccgclgcci lcacagggal gaaaaccclg 1260  
ctgaagagca tgcacgacgc caatccttcc tggggacctc tctatgtacg atatecggtt 1320  
gatctcactc cgcatcgcat ttactccgt tctgcgagct ag 1362

<210> 6

<211> 453

<212> PRT

<213> Brevibacillus choshinensis

&lt;400&gt; 6

Met Asn His Pro Asp Phe Arg Asp Leu Pro Ala Cys Met Glu Asp Val  
5 10 15  
Thr Leu Ala Ala Leu Asp Glu Tyr Thr Gly Pro Pro Asp Pro Thr Glu  
20 25 30  
Tyr Gln Ser Leu Tyr Gly Arg Leu Gln Glu Val Ala Glu Thr Leu Pro  
35 40 45  
Pro Leu Tyr Arg Glu His Val Tyr His Pro Phe Leu Gln Ala Met Asp  
50 55 60  
Lys Leu Ser Glu Ser Gly Phe Ala Gln Met Leu Arg Arg Asp Pro Gln  
65 70 75 80  
Lys Glu Arg Glu Ala Gly Leu Phe Cys Asp Ile Ala Gln Ala Ile Leu  
85 90 95  
Gln Asn Gly Glu Ala Tyr Glu Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Gln Glu  
100 105 110  
Val Val Ser Asp Leu Tyr Asp Gly Phe Leu Ser Glu Glu Asp Arg Ser  
115 120 125  
Gly Ile Lys Pro Pro Asp Glu Ser Leu Ile Ala Pro Leu Val Lys Trp  
130 135 140  
Gly Arg Pro Gln Phe Gly Pro Tyr Thr Trp Thr Ala Glu Ala Ala Ala  
145 150 155 160  
His Phe Gly Ile Lys Thr Gly Ile Val Asn Leu Pro Pro Ala Asn Ala  
165 170 175  
Arg Leu Gly Leu Leu Ala Trp Ser Ala Leu Gly His Glu Thr Ala Gly  
180 185 190  
His Asp Ile Leu His Ala Asp Thr Gly Leu Leu Gly Glu Leu Gln Gln  
195 200 205  
Thr Val Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Glu Leu His Asn Arg Thr Leu Ala  
210 215 220

Asp Tyr Trp Ser Leu Arg Ile Asp Glu Thr Ala Ser Asp Val Leu Gly  
225 230 235 240  
Ile Leu Asn Thr Gly Pro Ala Ala Gly Ile Gly Leu Ile Gly Tyr Phe  
245 250 255  
Arg Gly Leu Asn Lys Ala Tyr Thr Gly Gln Ala Thr Leu Arg Asn Thr  
260 265 270  
Gly Pro Gln Asn Asp Pro His Pro Ala Asp Ile Leu Arg Gly Tyr Leu  
275 280 285  
Ala Ala Glu Thr Ala Arg Leu Leu His Phe Asp Asn Ala Ser Asp Trp  
290 295 300  
Ala Gln Ala Leu Leu Glu Glu Thr Arg Arg Asp Leu Lys Gly Ile Thr  
305 310 315 320  
Ile Gly Arg Ala Ser Leu Asp Ala Glu Thr Ala Gln Lys Ser Ala Ala  
325 330 335  
Ile Val Ala Arg Thr Ile Met Glu Ala Arg Leu Leu Ser Leu Glu Gly  
340 345 350  
His Ala Leu Gly Gln Ile Gln Asn Trp His Asn Glu Asp Glu Arg Ile  
355 360 365  
Val Gln Glu Ile Arg Ser His Phe Thr Gly Ser Leu Thr Val Gln Asp  
370 375 380  
Gly Ile Val Ser Gly Met Tyr Ala Ala His Val Val Ala Ala Ala Val  
385 390 395 400  
Gln Ala Ala Val Ser Gly Glu Met Asp Thr Ser Ala Ala Phe Thr Gly  
405 410 415  
Met Lys Thr Leu Leu Lys Ser Met His Asp Ala Asn Pro Ser Trp Gly  
420 425 430  
Pro Leu Tyr Val Arg Tyr Arg Gly Asp Leu Thr Pro His Arg Ile Tyr  
435 440 445  
Ser Arg Ser Ala Ser

150	152	
<210>	7	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	7	
gggggtacct cactctgtca gcatgctg		28
<210>	8	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	8	
gggggatccc ggcgtgattc ccactgc		27
<210>	9	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	9	
gggctgcaga tagcggatga aggtgtg		27
<210>	10	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<400>	10	
gggtctagac ctgcttatac atctgtttcg		30
<210>	11	
<211>	39	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<400> 11

gagagaccat ggaccatcct gattttcgcg atctacccg

39

<210> 12

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

agaattcagt ggtggtggtg gtggtggtgg tggctcgcag aacgggagta aatgcgatgc

60

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

aaaagaattc tttctgcaga acaggatgcg ggggagccgc cgct

11

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

aaaaaggatc cttatagcat ctaatcttca acaaact

37

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

aaaaaaagat cttgaacgat gacctctaataa atttgtaa

39

<210> 16

<211> 43

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<400> 16

aaaagaattc aaatctagaa agtgtgtgct ctgcgaggct gtc

43

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

lccatggcac aatllgglat allatglaaa

30

<210> 18

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

actcgagtta tatgcgtcta tttatgtagg at

32

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ttttttctag actttatgaa tataaagtat agtgtgt

37

<210> 20

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

gggggcctgca gllalatgcg tclatlalag taggaag

37

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

aarcgngtnc ayacngayaa yct

23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

aancnglmg gylgnglylg gaa

23

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

cctcgtagtg cttttggtag aag

23

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

accaataaccg gagtgaacca gca

23

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

actatagggc acgcgtggt

19

<210> 26

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

ctcccatggc tttcgctacc cccgtgcagt ccgtggactg c 41

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

atataagctt ttagggagag aggacttcca tggt 34

<210> 28

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

tttctgcagg taaaatcgaa gaaggtaaac tggt 35

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

aaaaagcttt tacttgggtga tacgagtctg cgcg 34

<210> 30

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

ttttgatcc gaggaggtgt cggagaactg tagccac 37

<210> 31  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 31  
aaaaagcttc tacactggca gtcctcctg tctg 34  
<210> 32  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 32  
aaggatcccc gtcatatccg gca 23  
<210> 33  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 33  
aaaagcttta ggcgttatcc gcttttagc 28  
<210> 34  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 34  
tatatccatg gcttcttact gccaggcgcc cttttttaa 39  
<210> 35  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<400> 35

atataagctt ttattttgat gctctctggc cttggaa

37

<210> 36

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

atattcatga gcaacgactt gcttcgatcc ca

32

<210> 37

<211> 36

<212> DNA

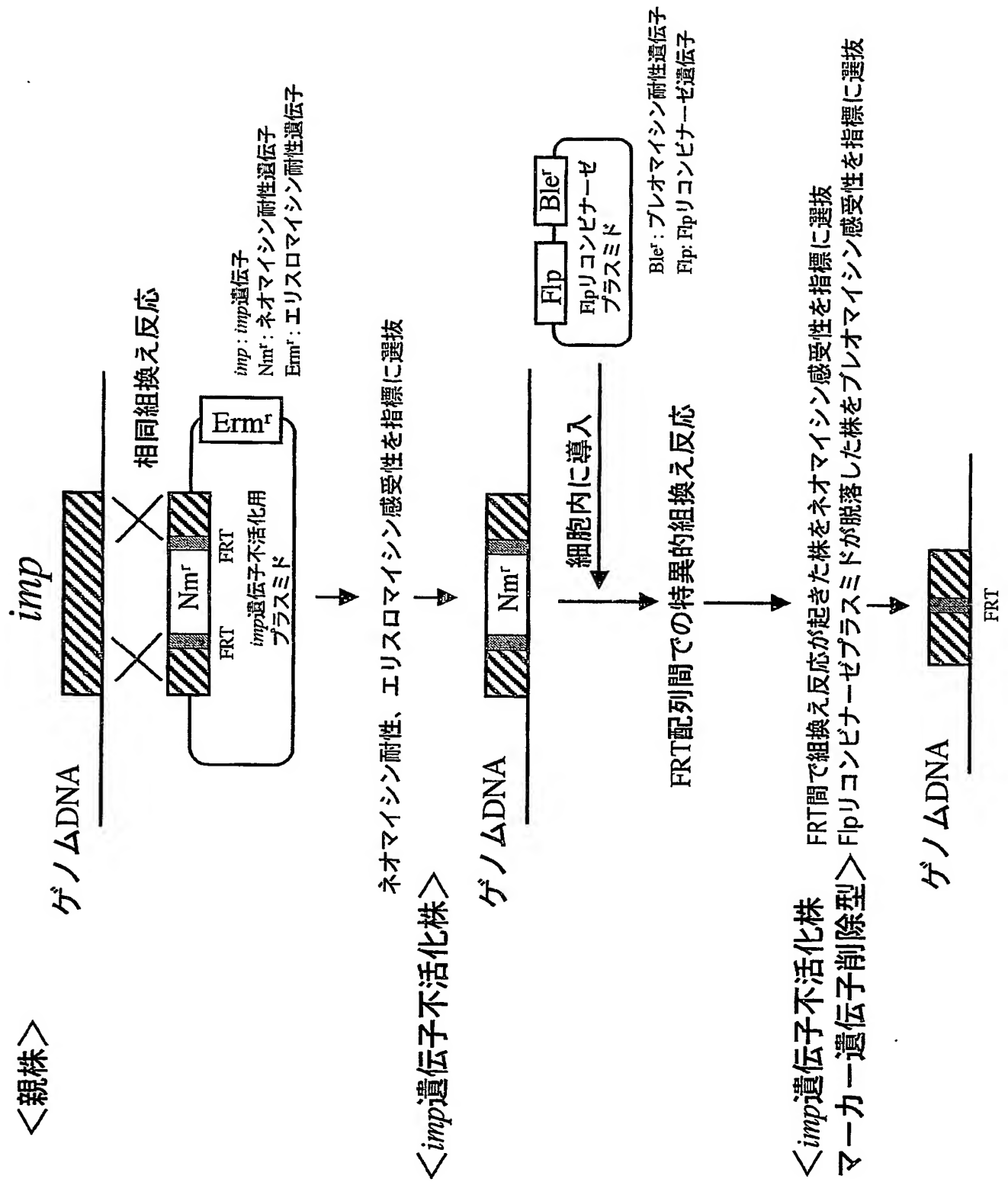
<213> Artificial Sequence

<400> 37

atataagctt tcagttctgg agataatctg taagta

36

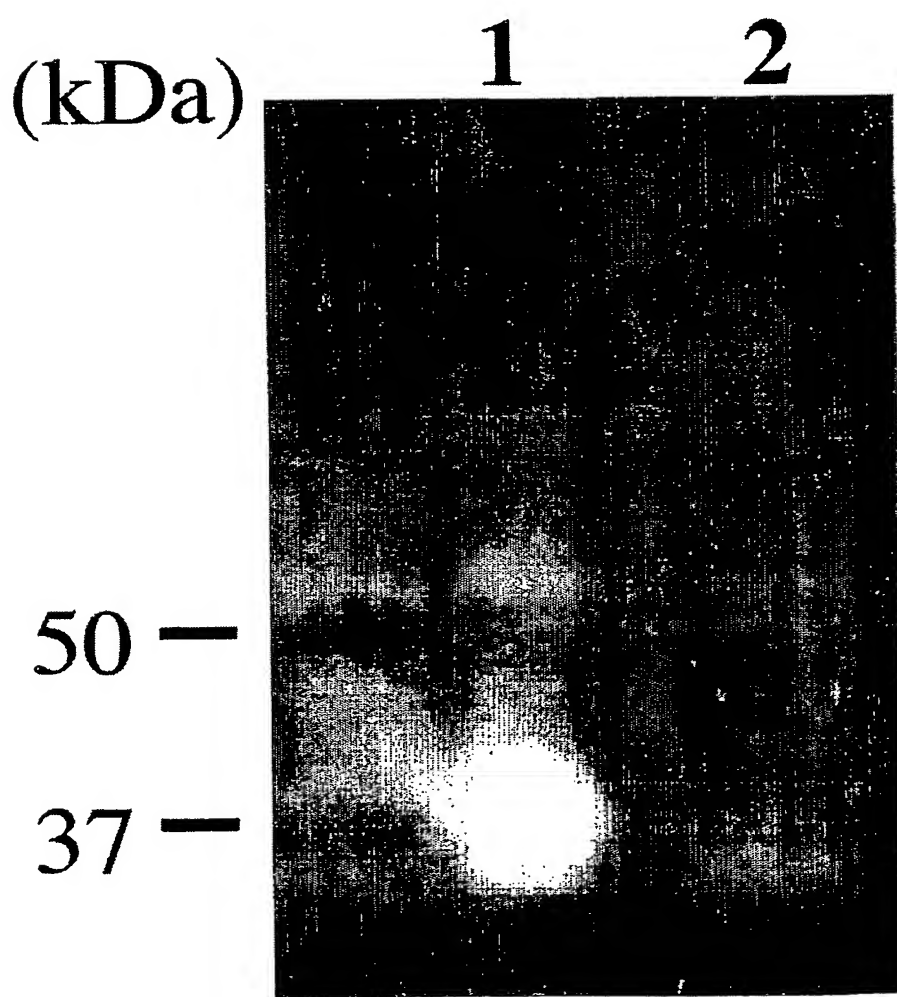
【書類名】 図面  
【図 1】



【図 2】

図面代用写真

# 培養上清画分 SDS-PAGE ザイモグラム



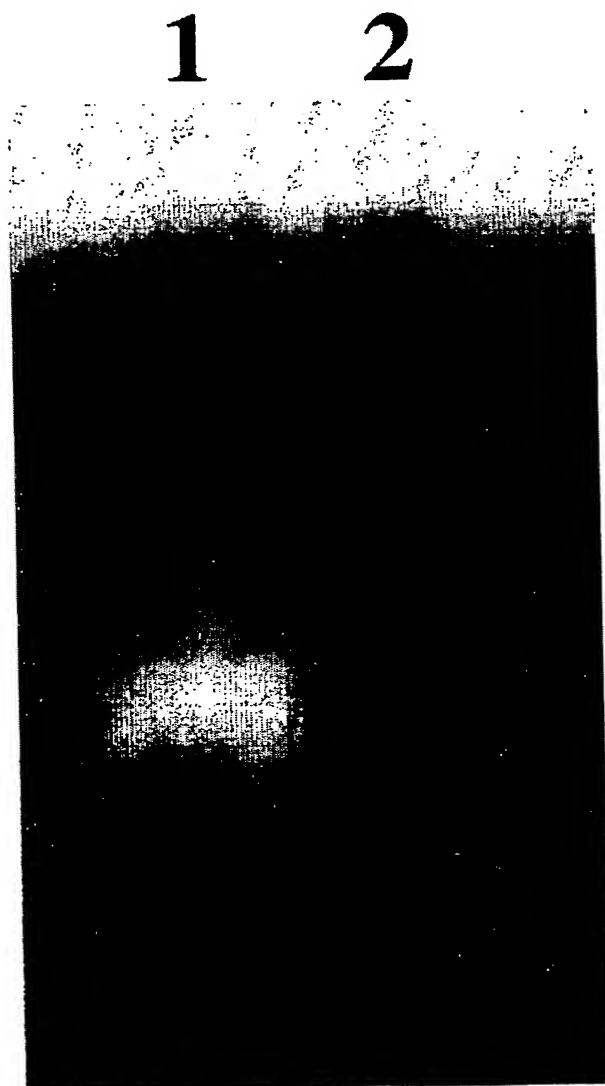
1. ブレバチルス・チョウシネンシス HPD31
2. ブレバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3

【図3】

図面代用写真

# 細胞内画分

Native-PAGE ギイモグラム

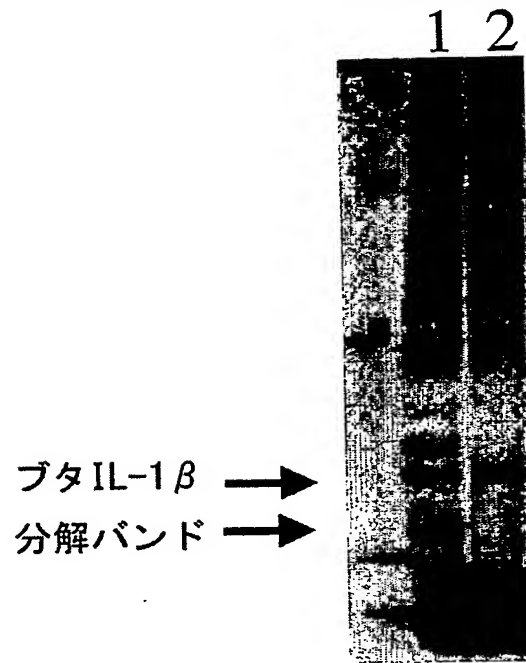


1. ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31
2. ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3



【図 4】

## 図面代用写真

ブタIL-1 $\beta$ の分泌生産および分解 (CBB染色)

- 1.ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31/pNY301-pIL-1 $\beta$
- 2.ブレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 /pNY301-pIL-1 $\beta$

【図 5】

## 図面代用写真

ブタIL-1 $\beta$  分泌生産および分解  
(抗ブタIL-1 $\beta$  抗体によるウエスタンブロット)

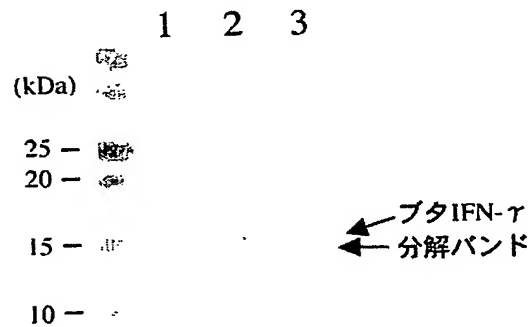
1 2

ブタIL-1 $\beta$  →  
分解バンド →

1. プレビパチルス・チョウシネンシス HPD31/pNY301-pIL-1 $\beta$
2. プレビパチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3 /pNY301-pIL-1 $\beta$

【図6】

## 図面代用写真

ブタIFN- $\gamma$ の細胞内への蓄積生産と分解抗ブタIFN- $\gamma$ 抗体によるウエスタンブロット

1. プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31/pNY301
2. プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31/pNY301-pIFN- $\gamma$
3. プレビバチルス・チョウシネンシス HPD31-SP3/pNY301-pIFN- $\gamma$

## 【図 7】

hos

1 ATGGGTGCCGATATCAAAAATGCGAGTCAACCATTTCTGACCAATGACCAAGTGAAAGAT 60  
MetGlyAlaAspIleLysAsnAlaSerGlnProPheLeuThrAsnAspGlnValLysAsp

61 TTGATAGCCAAGAGCCAAGCTGGCGATACGGATGCACGTGAGCTTCTCGTGAATAGCAAT 120  
LeuIleAlaLysSerGlnAlaGlyAspThrAspAlaArgGluLeuLeuValAsnSerAsn

121 ATCAGACTGGTCTGGTCCGTGCTCCAGCGCTTTATCAACCGCGGGTATGAAGCGGATGAT 180  
IleArgLeuValTrpSerValValGlnArgPheIleAsnArgGlyTyrGluAlaAspAsp

181 TTGTTTCAGATCGGTTGCATTGGCTTGCTCAAGGCCGTTGACAAGTTCGATCTTTCGTAC 240  
LeuPheGlnIleGlyCysIleGlyLeuLeuLysAlaValAspLysPheAspLeuSerTyr

241 GATGTGAGATTTTCGACCTATGCGGTGCCAATGATCATCGGAGAAATTCACGCTTTTTG 300  
AspValArgPheSerThrTyrAlaValProMetIleIleGlyGluIleGlnArgPheLeu

301 CGCGATGACGGTACGGTTAAGGTCAGTCGATCGTTAAAAGAAACAGCGAATAAGGTGCGG 360  
ArgAspAspGlyThrValLysValSerArgSerLeuLysGluThrAlaAsnLysValArg

361 CGATCAAAGGATGAATTGTACAAGCAATTCGGCCGTGCCCCACGATCGCAGAAAGTGGCA 420  
ArgSerLysAspGluLeuTyrLysGlnPheGlyArgAlaProThrIleAlaGluValAla

421 GAAGCAGTGGGAATCACGCCGGAGGAAGTAGTCTTTGCGCAAGAGGCAAGCAGAGCGCCT 480  
GluAlaValGlyIleThrProGluGluValValPheAlaGlnGluAlaSerArgAlaPro

481 TCCTCCATCCATGAGACCGTTTTTGAATGACGGCGATCCCATCACACTGATCGATCAG 540  
SerSerIleHisGluThrValPheGluAsnAspGlyAspProIleThrLeuIleAspGln

541 ATAGCGGATGAAGGTGTGAACAAGTGGTTTGAGAAAATTGCCTTGAAGGACGCCATCAGC 600  
IleAlaAspGluGlyValAsnLysTrpPheGluLysIleAlaLeuLysAspAlaIleSer

601 AGGCTGAGCGAGCGTGAGCAGCTCATCGTCTACCTGCGCTATTACAAGGATCAGACACAG 660  
ArgLeuSerGluArgGluGlnLeuIleValTyrLeuArgTyrTyrLysAspGlnThrGln

661 TCTGAGGTAGCAGAGCGTCTAGGGATTTGCGAGGTCCAGGTCTCGCGTCTGGAAAAGCGT 720  
SerGluValAlaGluArgLeuGlyIleSerGlnValGlnValSerArgLeuGluLysArg

## 【図 8】

721 ATCCTGCTAACGATCAAGGAGCAAATTGAACATTAG 756  
IleLeuLeuThrIleLysGluGlnIleGluHis\*\*\*

## 【図 9】

emp

1 GTGAACGCAGTGAAGAAAGGCAAGAAGCTATTATCCATCCTATTTTCTTCCTCACTGGTC 60  
ValAsnAlaValLysLysGlyLysLysLeuLeuSerIleLeuPheSerSerSerLeuVal

61 CTGAGCGGCATTGCGGCGGTTCCAGCGACAGGGATGGCCAAGTCAAAGGACAAGCCGCCG 120  
LeuSerGlyIleAlaAlaValProAlaThrGlyMetAlaLysSerLysAspLysProPro

121 CTTGAAGTGGATTTGTCCACAGTGAACATGGATCGTTTGGTTAAAGCCTTGATCGACCAA 180  
LeuGluValAspLeuSerThrValAsnMetAspArgLeuValLysAlaLeuIleAspGln

181 GGTGAAATCGACGAGGACGCCGACCAGGAAGAGATCAACAAAGCTGTGGAGAAGTTTTTG 240  
GlyGluIleAspGluAspAlaAspGlnGluGluIleAsnLysAlaValGluLysPheLeu

241 AGAGACAAGAAAGTTCCCCACGGCATTGATGACTCCAGCTCCTTCGGGAAAAAAGCAAGC 300  
ArgAspLysLysValProHisGlyIleAspAspSerSerSerPheGlyLysLysAlaSer

301 AAAACCCAGCTTTCGGCAGTATCAAAGGCAGCAAGCAAAGTATCCAAGCTCAAAGATGAC 360  
LysThrGlnLeuSerAlaValSerLysAlaAlaSerLysValSerLysLeuLysAspAsp

361 AAGCAAGTGC GCGCTTCCAAGCGGGTACATACGGATAATCTGGTGATTGCCCTGGTCGAG 420  
LysGlnValArgAlaSerLysArgValHisThrAspAsnLeuValIleAlaLeuValGlu

421 TTCAATGATCTGGAGCACAACCAGGTGCCAAAACAAAGCGATTCTTGTGGACGGCAGAC 480  
PheAsnAspLeuGluHisAsnGlnValProLysGlnSerAspSerLeuTrpThrAlaAsp

481 TTCGACCAAAGCACTACGAGGAAATGCTGTTTCGATCGTAAAGGCTATACGACTCCTGAA 540  
PheAspGlnLysHisTyrGluGluMetLeuPheAspArgLysGlyTyrThrThrProGlu

541 GGGATAAGCATGACCACGATGGCCAAGTACTACTACGAGCAATCGGGTGAGACATGGACC 600  
GlyIleSerMetThrThrMetAlaLysTyrTyrTyrGluGlnSerGlyGluThrTrpThr

601 GTGGATGGGGTTGTCACTCCGTGGTTGACTGCCGAAAAAGATAAGAAATTCTACGGTGGA 660  
ValAspGlyValValThrProTrpLeuThrAlaGluLysAspLysLysPheTyrGlyGly

661 AACGATGAAAACGGCAACGATGCCAACCCACGCGATCTGGTCGTCGAGACACTGGAATCT 720  
AsnAspGluAsnGlyAsnAspAlaAsnProArgAspLeuValValGluThrLeuGluSer

721 GTAGGGGATGCCATCAAGGGTCATGAAGAAGAATACGACCAACGCGACCCGTATGACTTG 780  
ValGlyAspAlaIleLysGlyHisGluGluGluTyrAspGlnArgAspProTyrAspLeu

781 GATGGAGACAGCGATCTGATGGAGCCGGATGGCATGCTGGACAACCTGATGCTGGTTCAC 840  
AspGlyAspSerAspLeuMetGluProAspGlyMetLeuAspAsnLeuMetLeuValHis

## 【図 10】

841 TCCGGTATTGGTGAAGAGACTGGGGAAGATGCGGATGCGATCTGGTCTCACCGCTGGACT 900  
SerGlyIleGlyGluGluThrGlyGluAspAlaAspAlaIleTrpSerHisArgTrpThr

901 CTGAAAAGCCGACAGAAATTCAGGCACCAGCCTGAAAGCTTACGACTACATGATTCAG 960  
LeuLysLysProThrGluIleProGlyThrSerLeuLysAlaTyrAspTyrMetIleGln

961 CCTGAAGATGGCGCACCCGGCGTATTCGCACATGAATACGGACACAACCTGGGACTGCCA 1020  
ProGluAspGlyAlaProGlyValPheAlaHisGluTyrGlyHisAsnLeuGlyLeuPro

1021 GATCTGTATGACACGACAAGACTGGGACATGATTCGCCGGTTGGCGCATGGTCGCTGATG 1080  
AspLeuTyrAspThrThrArgLeuGlyHisAspSerProValGlyAlaTrpSerLeuMet

1081 TCTTCGGAAGCCATACAGGTAAGATCTTCAAACCCAACCAACCGGATTTGATCCTTGG 1140  
SerSerGlySerHisThrGlyLysIlePheGlnThrGlnProThrGlyPheAspProTrp

1141 TCCAAATGATGCTGCAGGAAATGTATGGGGCAAGTGGATTGAGCCGCAAGTCATCAAT 1200  
SerLysMetMetLeuGlnGluMetTyrGlyGlyLysTrpIleGluProGlnValIleAsn

1201 TACGAAGACCTGAAAAACGGAAAAAGCAGGCTTCGCTCTACGATGGCAGCAGCCTCGAT 1260  
TyrGluAspLeuLysLysArgLysLysGlnAlaSerLeuTyrAspGlySerSerLeuAsp

1261 GAAGATGGCAAAGTCATCAAGCTGAATATGCCGCAAGTAGAGAAGACACCGCCGGTTCAA 1320  
GluAspGlyLysValIleLysLeuAsnMetProGlnValGluLysThrProProValGln

1321 CCGAAAGACGGCGATTATTCTTACTTCTCCGATGAGGGCGACAATCTGAACACGAAGATG 1380  
ProLysAspGlyAspTyrSerTyrPheSerAspGluGlyAspAsnLeuAsnThrLysMet

1381 ACTTCGGAAGTGATCGACCTGACAGGCGCCAGCTCCGCATCGATGAGCTTCGACTCCTGG 1440  
ThrSerGluValIleAspLeuThrGlyAlaSerSerAlaSerMetSerPheAspSerTrp

1441 AGAGCGATCGAGACCGGGTACGACTACCTGTACGTGAACGTGATTGATGTCGACTCAGGT 1500  
ArgAlaIleGluThrGlyTyrAspTyrLeuTyrValAsnValIleAspValAspSerGly

1501 GAGAGCACAACAGTAAAAGAGTACGATGACGAAACCAAAGGCTGGGATAAGGAAGAAATC 1560  
GluSerThrThrValLysGluTyrAspAspGluThrLysGlyTrpAspLysGluGluIle

1561 AGCCTGAACGATTTTCGCTGGCAAAAAGATTCAAGTCGAGTTCAACTACGTGACGGATGGC 1620  
SerLeuAsnAspPheAlaGlyLysLysIleGlnValGluPheAsnTyrValThrAspGly

1621 GGCTTGGCGATGTCCGGCTTCTATCTGGATAATTTTGCAGTCACAGCAGACGGCGAAGTA 1680  
GlyLeuAlaMetSerGlyPheTyrLeuAspAsnPheAlaValThrAlaAspGlyGluVal

1681 GTCTTCTCGGATGATGCAGAAGGCGACCAGAAGTTTGATCTGGATGGATTCATCCATTTC 1740  
ValPheSerAspAspAlaGluGlyAspGlnLysPheAspLeuAspGlyPheIleHisPhe

## 【図 1 1】

1741 GACGGCGAAGGCCAAAATGTACGACGCGTACTACCTGGTAGAGCTGCGCTCCCATGAAGGC 1800  
AspGlyGluGlyLysMetTyrAspAlaTyrTyrLeuValGluLeuArgSerHisGluGly

1801 GTGGACGAGGGTCTGAAATACTTCGCCGCAATGACACATTCTTCACGTATGATCCAGGT 1860  
ValAspGluGlyLeuLysTyrPheArgArgAsnAspThrPhePheThrTyrAspProGly

1861 CTGGTGATCTGGTACTACGATGGACGCTTTGGCAAAACGCAAGACAACAACACCAGCAAC 1920  
LeuValIleTrpTyrTyrAspGlyArgPheGlyLysThrGlnAspAsnAsnThrSerAsn

1921 CATCCAGGCTACGGCATGCTGGGCGTAGTCGATGCGCATCAGGAAGTTCGTTACTGGAAT 1980  
HisProGlyTyrGlyMetLeuGlyValValAspAlaHisGlnGluValArgTyrTrpAsn

1981 AACGATGAGGGCAACGAGGAGGCCATTGCCGACTCCCGTTACCAAGTGAACGATGCGGCA 2040  
AsnAspGluGlyAsnGluGluAlaIleAlaAspSerArgTyrGlnValAsnAspAlaAla

2041 TTCAGCCCGAACAAAACCTCCGGCATGGATCTCGACTACATTCTCGGCACGATGGATTAC 2100  
PheSerProAsnLysThrSerGlyMetAspLeuAspTyrIleLeuGlyThrMetAspTyr

2101 GAGCCGCTGAAAGGCATTACCGTATTCAAAGACAGTGATGATTACACGATGCCGGAAGTT 2160  
GluProLeuLysGlyIleThrValPheLysAspSerAspAspTyrThrMetProGluVal

2161 CCGGAAATCGGAAAAATCCTGCCGAAGATCGGTCTGCAAATCAAATTAATTCGTGTGTCC 2220  
ProGluIleGlyLysIleLeuProLysIleGlyLeuGlnIleLysLeuIleArgValSer

2221 AAGAAATTCACGAACGCACAGGTCGAGTTCTCCATCAAAAAATAA 2265  
LysLysPheThrAsnAlaGlnValGluPheSerIleLysLys\*\*\*



## 【図 12】

imp

1 ATGAACCATCCTGATTTTCGCGATCTACCCGCCTGCATGGAAGACGTAACCCTCGCTGCC 60  
MetAsnHisProAspPheArgAspLeuProAlaCysMetGluAspValThrLeuAlaAla

61 CTGGACGAGTACACTGGTCCACCAGATCCGACCGAATACCAATCATTGTATGGACGCTTG 120  
LeuAspGluTyrThrGlyProProAspProThrGluTyrGlnSerLeuTyrGlyArgLeu

121 CAAGAGGTTGCCGAACTCTCCCTCCGCTCTATCGGGAGCATGTGTATCACCTTTTCTT 180  
GlnGluValAlaGluThrLeuProProLeuTyrArgGluHisValTyrHisProPheLeu

181 CAAGCGATGGACAAGTTGTCTGAGTCAGGATTTGCGCAGATGCTCCGTCGAGATCCTCAA 240  
GlnAlaMetAspLysLeuSerGluSerGlyPheAlaGlnMetLeuArgArgAspProGln

241 AAAGAGCGAGAAGCCGGTCTGTTTTGCGATATCGCACAGGCCATTCTGCAAAACGGCGAA 300  
LysGluArgGluAlaGlyLeuPheCysAspIleAlaGlnAlaIleLeuGlnAsnGlyGlu

301 GCGTATGAACGCGATGCCACGGATGCCTTTCAGGAAGTAGTCAGCGATTTGTACGACGGT 360  
AlaTyrGluArgAspAlaThrAspAlaPheGlnGluValValSerAspLeuTyrAspGly

361 TTTTAAAGCGAGGAAGACAGGAGTGGCATCAAACCGCCTGATGAAAGCTTGATTGCTCCT 420  
PheLeuSerGluGluAspArgSerGlyIleLysProProAspGluSerLeuIleAlaPro

421 CTGGTCAAATGGGGACGCCCGCAATTCGGACCTTATACGTGGACAGCTGAAGCCGCTGCC 480  
LeuValLysTrpGlyArgProGlnPheGlyProTyrThrTrpThrAlaGluAlaAlaAla

481 CATTTTGGCATCAAGACGGGCATTGTCAATTTGCCCCGGCAAACGCCCGCCTGGGTCTG 540  
HisPheGlyIleLysThrGlyIleValAsnLeuProProAlaAsnAlaArgLeuGlyLeu

541 CTCGCGTGGTCTGCATTAGGTACGAAACGGCTGGACACGACATTCTCCACGCCGACACC 600  
LeuAlaTrpSerAlaLeuGlyHisGluThrAlaGlyHisAspIleLeuHisAlaAspThr

601 GGTGTTGCTTGGAGAACTGCAGCAAACCGTCTATGACGCTTTGTTTGATGAGCTTCACAAT 660  
GlyLeuLeuGlyGluLeuGlnGlnThrValTyrAspAlaLeuPheAspGluLeuHisAsn

661 CGGACGCTGGCGGACTACTGGTCGCTCCGAATCGACGAGACTGCCTCCGACGTTTTGGGA 720  
ArgThrLeuAlaAspTyrTrpSerLeuArgIleAspGluThrAlaSerAspValLeuGly

721 ATCCTGAACACCGGCCCGCTGCAGGGATTGGACTGATTGGATATTTCCGCGGCCTTAAT 780  
IleLeuAsnThrGlyProAlaAlaGlyIleGlyLeuIleGlyTyrPheArgGlyLeuAsn

781 AAGGCGTACACCGGACAAGCAACACTGCGGAATACAGGGCCACAGAATGACCCACATCCA 840  
LysAlaTyrThrGlyGlnAlaThrLeuArgAsnThrGlyProGlnAsnAspProHisPro

## 【図 13】

841 GCAGACATCTTGCGCGGTTATCTTGCTGCTGAGACTGCTCGTCTGCTGCATTTTGACAAC 900  
 AlaAspIleLeuArgGlyTyrLeuAlaAlaGluThrAlaArgLeuLeuHisPheAspAsn  
 901 GCATCCGACTGGGCACAGGCACTTCTCGAGGAAACCAGGCGTGATCTTAAAGGCATCACA 960  
 AlaSerAspTrpAlaGlnAlaLeuLeuGluGluThrArgArgAspLeuLysGlyIleThr  
 961 ATAGGCAGAGCCTCTTTGGATGCAGAAACCGCTCAAAAATCTGCTGCCATTGTCGCTCGC 1020  
 IleGlyArgAlaSerLeuAspAlaGluThrAlaGlnLysSerAlaAlaIleValAlaArg  
 1021 ACAATTATGGAAGCACGCCTGCTCAGTCTGGAAGGTCATGCCCTCGGGCAAATTCAAAAC 1080  
 ThrIleMetGluAlaArgLeuLeuSerLeuGluGlyHisAlaLeuGlyGlnIleGlnAsn  
 1081 TGGCACAACGAGGATGAACGAATCGTTCAGGAAATTCGCTCCCATTTTACAGGTTCCCTG 1140  
 TrpHisAsnGluAspGluArgIleValGlnGluIleArgSerHisPheThrGlySerLeu  
 1141 ACCGTGCAAGACGGCATTGTTTCGGGTATGTATGCTGCGCATGTGCTGGCAGCAGCCGTC 1200  
 ThrValGlnAspGlyIleValSerGlyMetTyrAlaAlaHisValValAlaAlaAlaVal  
 1201 CAAGCAGCCGTTTCAGGAGAGATGGATACCTCCGCTGCCTTCACAGGGATGAAAACCTTG 1260  
 GlnAlaAlaValSerGlyGluMetAspThrSerAlaAlaPheThrGlyMetLysThrLeu  
 1261 CTGAAGAGCATGCACGACGCCAATCCTTCCTGGGGACCTCTCTATGTACGATATCGCGGT 1320  
 LeuLysSerMetHisAspAlaAsnProSerTrpGlyProLeuTyrValArgTyrArgGly  
 1321 GATCTCACTCCGCATCGCATTTACTCCCGTTCTGCGAGCTAG 1362  
 AspLeuThrProHisArgIleTyrSerArgSerAlaSer\*\*\*

## 【図 14】

プライマー名	オリゴヌクレオチド配列
Hos P1	gggggtacctcactctgtcagcatgctg
Hos P2	gggggatcccggtgattcccactgc
Hos P3	gggctgcagatagcggatgaagggtgtg
Hos P4	gggtctagacctgcttatacatctgtttcg

## 【図 15】

プライマー	オリゴヌクレオチド配列
imp P1	gagagaccATGGACCATCCTGATTTTCGCGATCTACCCG
imp P2	agaattcagtggtggtggtggtggtggtGCTCGCAGAACGGGAGTAAATGCGATGC

## 【図 16】

flp P1: aaaagaattctttctgcagaacaggatgcgggggagccgccgct

## 【図 17】

flp P2: aaaaaggatccttatagcatctaatttcaacaaact

## 【図 18】

flp P3: aaaaaaagatcttgaacgatgacctctaataattgttaa

## 【図 19】

flp P4: aaaagaattcaaacttagaaagtgtgtgctctgcgaggctgtc

## 【図 20】

flp P5: tccatggcacaatttggtatattatgtaaa

## 【図 21】

flp P6: actcgagttatatgcgtctatttatgtaggat

## 【図 22】

flp P7: ttttttctagactttatgaatataaagtatagtgtgt

## 【図 23】

flp P8: gggggctgcagttatatgcgtctatttatgtaggatg

## 【図 24】

プライマー名	アミノ酸配列データ	プライマーのオリゴヌクレオチド配列
emp P1	LysArgValHisThrAspAsnLeu	aaRcgIgtNcaYacNgaYaaYct
emp P2	PheGlnThrGlnProThrGlyPhe	aaNcclgtNggYtgNgtYtgaa

! : イノシン, R : A or G, Y : C or T, N : A or G or T or C

## 【図 25】

プライマー名	オリゴヌクレオチド配列
emp P3	cctcgtagtcttttggtcgaag
emp P4	accaataccggagtgaaccagca
アダプタープライマー	actatagggcacgcgtggt

## 【図 26】

ctcccatggctttcgctacccccgtgcagtcggtggactgc

## 【図 27】

atataagcttttagggagagaggacttccatggt

## 【図 28】

tttctgcaggtaaaatcgaagaaggtaaactggta

## 【図 29】

aaaaagcttttacttggtgatacgagtctgcgcg

## 【図 30】

tttggatccgaggaggtgtcggagaactgtagccac

## 【図 31】

aaaaagcttctacactggcagctcctcctgtctg

## 【図 32】

aaggatccccgtcatatccggca

## 【図 33】

aaaagctttaggcgttatccgctttagc

## 【図 34】

tatatccatggcttcttactgccaggcgcccttttta

## 【図 35】

atataagcttttatgttgatgctctctggccttggaa

【図 3 6】

atattcatgagcaacgacttgcttcgatccca

【図 3 7】

atataagctttcagttctggagataatctgtaagta

## 【書類名】要約書

## 【要約】

【課題】 *Brevibacillus choshinensis* は、細胞外のタンパク質分解活性が著しく低く、なおかつタンパク質の分泌生産性にもすぐれた特性を有しているが、該活性を更に低減することが希求されているだけでなく、細胞内のタンパク質分解活性の低減も希求されている。また、一方タンパク質医薬品等の宿主として本菌を利用する場合、胞子を形成せず、殺菌処理が容易に実施されることも希求されている。

【解決手段】 胞子形成関連遺伝子の不活化、及び細胞外、細胞内のタンパク質分解酵素遺伝子のクローニング、不活化により上記課題を解決した。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 8 1 6 0 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 1 2 0 6 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋小網町 2 番 3 号

氏 名

ヒゲタ醤油株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/016912

International filing date: 08 November 2004 (08.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-381606  
Filing date: 11 November 2003 (11.11.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse